



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

Escola Superior Agrária de Beja

Mestrado em Engenharia Alimentar

**Degradação química de azeites virgens extraídos das cultivares
Arbequina, Arbosana e Koroneiki**

Tiago José Leal Vieira

Beja

2016

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

Escola Superior Agrária de Beja

Mestrado em Engenharia Alimentar

**Degradação química de azeites virgens extraídos das cultivares
Arbequina, Arbosana e Koroneiki**

**Relatório de projeto de dissertação de mestrado apresentada na Escola Superior
Agrária do Instituto Politécnico de Beja**

Elaborado por:

Tiago José Leal Vieira

Orientado por:

Doutora Isabel Maria Pereira Caldas Baer

Beja

2016

Agradecimentos

A concretização desta tese de mestrado só foi possível graças ao apoio e ajuda prestada, direta ou indiretamente, de várias pessoas às quais eu gostaria de expressar o meu sincero agradecimento.

- À orientadora Doutora Isabel Baer.
- Ao professor Doutor Nuno Bartolomeu.
- À professora Doutora Silvina Ferro Palma.
- À Fernanda Fragoso e à Maria Diogo.
- À minha família, em especial os meus pais, irmã e avó.
- À minha namorada.
- A todos os meus amigos.

Resumo

O azeite virgem é o principal componente da dieta mediterrânea. O seu consumo tem vindo a aumentar, como consequência dos efeitos benéficos para a saúde. A degradação do azeite começa a partir do momento em que se colhem as azeitonas e é acelerada pela influência de vários fatores como a tecnologia de extração escolhida ou as condições de armazenamento, embalagem e exposição nas superfícies comerciais. A preocupação em garantir a qualidade do azeite durante o tempo que decorre desde a extração até chegar ao consumidor é cada vez mais importante e determinante do tempo de prateleira do produto.

O principal objetivo deste trabalho, dividido em dois ensaios, é contribuir para o conhecimento da degradação química de azeites virgens provenientes das cultivares Arbequina, Arbosana e Koroneiki, analisando a influência da exposição à luz artificial durante o armazenamento e do tipo de moinho utilizado durante a etapa de moenda da azeitona. Realizaram-se as seguintes análises: percentagem de acidez, índice de peróxidos, índices espectrofotométricos, pigmentos clorofilinos e carotenoides, cor e compostos fenólicos totais.

Concluiu-se que a exposição à luz provocou uma grande diminuição do teor de compostos fenólicos e de pigmentos, mais acentuada dos pigmentos clorofilinos tendo como consequência o desaparecimento da cor verde e o realce da cor amarelada. Durante a moenda da azeitona, o moinho de martelos provocou, simultaneamente, uma maior extração de pigmentos e um ligeiro aumento da acidez, obtendo-se azeites com mais cor mas mais sensíveis à foto-oxidação.

Palavras-chave: degradação química, foto-oxidação, azeite virgem, moinho de discos, moinho de martelos.

Abstract

The virgin olive oil is the main component of the Mediterranean diet. Its consumption has been increasing as a consequence of beneficial effects on health. Degradation of olive oil starts from the time olives are harvested and is accelerated by the influence of various factors such as the extraction technology chosen or the conditions of storage, packaging and exposure on commercial surfaces. The concern to guarantee the quality of the olive oil during the time from extraction until reaching the consumer is increasingly important and determinant of the shelf life of the product.

The main objective of this work, divided in two trials, is to contribute to the knowledge of the chemical degradation of virgin olive oils from the cultivars Arbequina, Arbosana and Koroneiki, analyzing the influence of exposure to artificial light during storage and the type of mill used during Step of milling the olives. The following analyzes were performed: percentage of acidity, peroxide index, spectrophotometric indexes, chlorophylline and carotenoid pigments, color and total phenolic compounds.

It was concluded that the exposure to light caused a great decrease in the content of phenolic compounds and pigments, more pronounced of the chlorophylline pigments resulting in the disappearance of the green color and the enhancement of the yellowish color. During the milling of the olive, the hammer mill simultaneously caused a greater extraction of pigments and a slight increase of the acidity, obtaining oils with more color but more sensitive to the photo-oxidation.

Keywords: Chemical degradation, photo-oxidation, virgin olive oil, disc mill, hammer mill.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
Índice Geral.....	iv
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas	viii
 Capítulo 1 – Introdução.....	 1
1.1 – Estrutura do trabalho	2
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 – A azeitona	4
2.1.1 – Composição.....	4
2.1.2 – Crescimento e maturação	6
2.1.3 – Cultivares	8
2.1.3.1 – Arbequina.....	8
2.1.3.2 – Arbosana	8
2.1.3.3 – Kororeiki	9
2.2 – O Azeite Virgem	9
2.2.1 – Composição química.....	10
2.2.1.1 – Fração saponificável.....	11
2.2.1.2 – Fração insaponificável	13
2.2.2 – Qualidade do azeite	17
2.2.3 – Reações de degradação	18
2.3 – Tecnologia de extração de Azeite Virgem	21
2.3.1 – Método contínuo de extração centrífugo de duas fases.....	22
2.3.2 – Moinhos utilizados na etapa da moenda	24
2.3.3 – Armazenamento e Embalamento	26
Capítulo 3 – Procedimento experimental	29
3.1 – Apresentação da empresa.....	29
3.2 – Delineamento	29
3.3 - Métodos analíticos	31

3.3.1 – Percentagem de Acidez.....	31
3.3.2 – Índice de Peróxidos.....	31
3.3.3 – Índices Espectrofotométricos (K_{232} e K_{270}).....	32
3.3.4 – Pigmentos clorofilinos e carotenoides.....	32
3.3.5 – Cor.....	33
3.3.6 – Compostos Fenólicos Totais	33
3.4 – Tratamento estatístico dos resultados.....	35
3.4.1- Análise descritiva e análise de variância	35
Capítulo 4 – Resultados e Discussão	37
4.1 – Resultados obtidos para os azeites virgem extra extraídos das cultivares Koroneiki, Arbequina e Arbosana após exposição à luz.....	37
4.1.1 - Estatística descritiva e análise de variância	37
4.1.2 – Comparação gráfica entre as três cultivares	46
4.1.3 – Análise dos componentes principais	56
4.2 – Resultados obtidos para o azeite virgem extra proveniente da moenda no moinho de discos e no moinho de martelos	60
Capítulo 5 – Conclusão	67
Referências bibliográficas.....	69

Índice de Figuras

Figura 1 – Fórmula da oleuropeína (adaptado de Ribeiro, 2005)	6
Figura 2 – Fórmula do hidroxitirosol (adaptado de Ribeiro, 2005)	14
Figura 3 - Representação geral do mecanismo da oxidação lipídica (Ramalho et al., 2006).....	20
Figura 4 - Esquema do método contínuo de extração centrífugo de duas fases.....	24
Figura 5 - Moinhos de discos e de martelos (Alfa Laval, 2015)	26
Figura 6 - Entrada da azeitona no tegão e saída do azeite na centrífuga vertical.....	30
Figura 7 - Amostras de azeite extraídas das cultivares Arbequina, Arbosana e Koroneiki expostas à luz	37
Figura 8 – Evolução da percentagem de acidez nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.	47
Figura 9 - Evolução do índice de peróxidos nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.	48
Figura 10 – Índice K_{270} para as três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.	49
Figura 11 – Índice K_{232} para as três amostras de azeite durante o tempo de exposição à luz.	50
Figura 12 - Evolução dos pigmentos clorofilinos nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.	51
Figura 13 - Evolução dos pigmentos carotenoides nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.	52
Figura 14 – Evolução dos compostos fenólicos totais nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.	53
Figura 15 - Evolução da luminosidade nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.	54
Figura 16 - Evolução da tonalidade nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.	55
Figura 17 - Evolução da cromaticidade nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.	55
Figura 18 - Distribuição dos atributos no plano.	58
Figura 19 - Projeção das amostras ao longo das horas de exposição no plano principal.	58
Figura 20 - Moinhos de discos e de martelos montados em paralelo durante o ensaio	60
Figura 21 - Percentagem de acidez dos três lotes de azeite virgem obtidos de azeitonas moídas no moinho de discos e moinho de martelos.	63
Figura 22 - Pigmentos clorofilinos dos três lotes de azeite virgem obtidos de azeitonas moídas no moinho de discos e moinho de martelos.	63
Figura 23 - Pigmentos carotenoides dos três lotes de azeite virgem obtidos de azeitonas moídas no moinho de discos e moinho de martelos.	64
Figura 24 - Luminosidade dos três lotes de azeite virgem obtidos de azeitonas moídas no moinho de discos e moinho de martelos.	65
Figura 25 - Tonalidade dos três lotes de azeite virgem obtidos de azeitonas moídas no moinho de discos e moinho de martelos.	65
Figura 26 - Cromaticidade dos três lotes de azeite virgem obtidos de azeitonas moídas no moinho de discos e moinho de martelos.	66

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Codificação das amostras relativamente às horas de exposição à luz	37
Tabela 2 – Caraterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras analisadas de azeite virgem da cultivar Koroneiki	38
Tabela 3 – Caraterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras analisadas de azeite virgem da variedade Arbequina	41
Tabela 4 - Caraterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras analisadas de azeite virgem da variedade Arbosana.....	44
Tabela 5 - Valores próprios e extração dos componentes principais.	56
Tabela 6 - Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.....	57
Tabela 7 – Caraterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras analisadas de azeite virgem resultante da moenda por Moinho de Discos e Moinho de Martelos	61

Lista de Abreviaturas

% - Percentagem

cm - Centímetro

g - Gramas

h - Horas

ha - Hectare

IP - Índice de Peróxidos

K₂₃₂ - Índice espectrofotométrico, medido na região do ultra-violeta a 232 nm

K₂₇₀ - Índice espectrofotométrico, medido na região do ultra-violeta a 270 nm

Kg - Quilograma

L - Litros

LCP - Laboratório de Carne e Pescado

LVA - Laboratório de Vinho e Azeite

Meq - Miliequivalentes

mg - Miligrama

ml - Mililitros

nm - Nanómetros

°C - Graus Celsius

pH - Potencial de hidrogénio

Capítulo 1 – Introdução

O azeite, óleo extraído da azeitona, fruto da oliveira (*Olea Europea L.*) é usado na gastronomia desde a antiguidade, sendo um dos principais constituintes da dieta mediterrânea, apresentando um elevado interesse socio-económico. Foi, desde sempre, obtido exclusivamente por processos mecânicos, conservando o sabor, o aroma e todas as propriedades do fruto do qual tem origem, pelo que possui características organoléticas particulares, com uma composição química única, ocupando assim, uma posição privilegiada relativamente a outros óleos e gorduras vegetais (Ferreira, 2012).

A sua importância ao longo dos tempos resultou das múltiplas utilizações que lhe foram dadas: na alimentação, medicina, produto de beleza, combustível para iluminação, lubrificante para as ferramentas e alfaías agrícolas, impermeabilizante para as fibras têxteis e elemento essencial em ritos religiosos (Gouveia, 2002).

Mais recentemente, o seu consumo tem vindo a alargar-se a outras regiões para além dos países mediterrânicos. Para esta expansão têm contribuído de forma muito significativa as intrínsecas propriedades nutricionais que este produto apresenta, nomeadamente a presença de ácidos gordos monoinsaturados, cuja ingestão favorece o sistema cardiovascular na medida em que permite controlar os níveis de colesterol no sangue equilibrando o “mau” colesterol (LDL) e aumenta o teor de lipoproteínas de alta densidade, o “bom” colesterol (HDL), e de compostos minoritários com ação antioxidante, anti-inflamatória e anticoagulante (Ferreira, 2012).

O azeite virgem é considerado o melhor óleo vegetal devido às suas características organoléticas, estabilidade oxidativa e composição química, sendo o único que pode ser consumido diretamente em cru e contém elementos nutricionais importantes, entre os quais se destacam as vitaminas e os antioxidantes (Baccouri *et al.*, 2008).

Apesar de ser usado na culinária desde há séculos, o azeite tem sido, mais recentemente, alvo de uma intensa investigação científica com vista a obter-se informação mais precisa acerca dos benefícios deste alimento para a saúde humana (Boskou, 2007).

Os estudos científicos desenvolvidos têm incidido em aspetos muito diversos, dos quais se destacam: a composição química e a sua relação com os efeitos benéficos para a saúde associados à ingestão deste produto, assim como, a definição de parâmetros que

permitam assegurar a qualidade e autenticidade deste produto de elevado valor económico. Em particular, a qualidade do azeite virgem pode ser influenciada por diversos fatores que vão desde a qualidade da matéria-prima utilizada para a sua extração (azeitonas), o tipo de processo tecnológico para a sua obtenção até às condições de embalagem e armazenamento (oxigénio, luz, temperatura, metais, etc.) que podem ter como consequência a sua deterioração devido a reações de oxidação e hidrólise. A inadequabilidade de algum procedimento ao longo destas fases pode comprometer irremediavelmente a qualidade final do azeite, podendo tornar inviável a sua comercialização (Ferreira, 2012; Méndez *et al*, 2007).

O consumidor é cada vez mais exigente com a qualidade dos produtos alimentares e com a durabilidade dos mesmos até ao ato de consumo. Estas expectativas têm como consequência a obrigatoriedade da implementação de requisitos que conduzem não só à obtenção de produtos seguros mas também com o mínimo de resistência às alterações desvantajosas da qualidade sensorial (Morelló *et al.*, 2004).

Assim, é no contexto da qualidade química do azeite, mais concretamente no efeito das condições de armazenamento a que está sujeito e da escolha do equipamento de extração, que surge o presente trabalho desenvolvido no âmbito desta tese de mestrado, a pedido de uma empresa da região. Para cumprir os objetivos propostos, realizaram-se dois ensaios. O primeiro ensaio desenvolvido visou investigar de que forma o armazenamento do azeite ao longo do tempo em presença de luz artificial influencia os parâmetros químicos da qualidade para cada uma das três variedades de azeitona em estudo: Arbequina, Arbosana e Koroneiki, de modo a inferir se a variedade utilizada para a extração de azeite apresenta um efeito significativo na estabilidade oxidativa dos diferentes azeites em análise. O segundo ensaio testou a utilização de dois tipos de moinho na etapa de moenda da azeitona da cultivar Koroneiki: moinho de discos e moinho de martelos, analisando-se a variação na composição do azeite extraído à saída da centrífuga vertical.

1.1 – Estrutura do trabalho

O trabalho apresenta-se estruturado em cinco capítulos independentes, divididos em sub-capítulos. Ao primeiro capítulo introdutório segue-se o capítulo dois que apresenta uma revisão bibliográfica sobre os temas desenvolvidos na parte experimental. Faz-se

inicialmente uma abordagem à composição da azeitona e caracterizam-se as três cultivares utilizadas nos ensaios. De seguida descreve-se a composição química do azeite virgem e as principais reações de degradação a que pode estar sujeito, terminando o capítulo com uma breve explicação do método de extração centrífugo de duas fases, dando-se um maior ênfase à etapa de moenda e aos tipos de moinhos utilizados pela indústria. O capítulo três descreve o procedimento experimental utilizado no desenvolvimento do trabalho, incluindo as análises químicas e estatística utilizadas para verificar a composição química das várias amostras de azeite estudadas nos dois ensaios. No capítulo 4 são apresentados, em tabelas e gráficos, e discutidos os resultados obtidos, comparando-os, sempre que possível, com trabalhos realizados por outros autores. O capítulo 5 apresenta as conclusões gerais do trabalho e no final encontra-se referida a bibliografia consultada.

A parte experimental do trabalho foi organizada em dois ensaios, descritos no capítulo três deste trabalho.

No primeiro ensaio as amostras de azeite virgem extraídas das cultivares Arbequina, Arbosana e Koroneiki num estado de maturação intermédio (nível 3 do Índice de Jaen) e em dias determinados, foram obtidas à saída da centrífuga vertical para um garrafão com capacidade de 5 litros e imediatamente transportadas e armazenadas a -20°C na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja. Após obtenção das amostras das três cultivares, cada uma delas foi dividida em 9 sub-amostras, colocadas em frascos de vidro transparente de 250 ml: uma inicial que foi imediatamente analisada e as restantes 8 que foram expostas à luz artificial contínua, sendo retirada uma amostra a cada 10 dias (240 horas) para análise, totalizando 80 dias (1920 horas) de exposição à luz artificial. Pretendeu-se saber de qual das três cultivares de azeitona se obtinha o azeite mais resistente à foto-oxidação, condição a que são normalmente sujeitos nas superfícies comerciais.

O segundo ensaio, realizado com azeites virgens extraídos da cultivar Koroneiki no mesmo lagar, pretendeu estudar a influência do equipamento utilizado no processo de extração, mais concretamente do tipo de moinho escolhido para a etapa de moenda, na composição química do azeite virgem. Assim, de três lotes de azeitona Koroneiki chegadas ao lagar em três dias consecutivos, parte foi moída num moinho de martelos e a outra parte de cada lote num moinho de discos, ambos da mesma marca. Obtiveram-

se, assim, para cada moinho, três amostras de azeite, recolhidas à saída da centrífuga vertical para garrafas de vidro de 500 ml. As amostras foram transportadas no mesmo dia da extração para a Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja, onde ficaram armazenadas a -20°C até à data da análise.

Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

2.1 – A azeitona

2.1.1 – Composição

A *Olea europaea* L., a oliveira, é a única espécie da família Oleaceae com fruto comestível. É uma das plantas cultivadas mais antigas, cujas origens como cultura são de há 4000 – 3000 a.C. na zona da Palestina (Rapoport, 1998). Atualmente cerca de 95% da superfície oleícola mundial está concentrada na Bacia Mediterrânica, sendo que os países produtores da União Europeia (Espanha, Itália, Grécia, Portugal e França) são responsáveis por cerca de 70% da produção a nível mundial. Os outros principais países produtores são a Tunísia (8,1%), a Turquia (7,2%), a Síria (7,3%), Marrocos (3,7%) e a Argélia (2,1%) (Baer, 2015).

A azeitona é uma drupa de forma oval mais ou menos alongada ou arredondada, de acordo com a cultivar. É constituída pelo epicarpo (parte externa) que representa 1,5% - 3% do peso total, o mesocarpo ou polpa 65% - 83%, o endocarpo ou caroço 15% - 30% e a semente ou amêndoa 1,5% - 5% (Curci, 2001).

O peso do fruto é variadíssimo, oscilando entre 1,5 e 12g (Baer, 2006), embora nas variedades para obtenção de azeite os valores se situem, normalmente, entre 1,5 e 5,0g (Ruiz *et al.*, 1991).

De acordo com Curci (2001), a composição química da drupa pode resumir-se da seguinte maneira:

- Água: 50%
- Lípidos: 18% - 25%
- Proteínas: 1,6%
- Hidratos de Carbono: 19% - 20%

- Fibra: 5% - 6%
- Cinza: 1,5%

A zona epicárpica da azeitona é rica sobretudo em compostos derivados da série amirínica, assim como em produtos esterificados dos álcoois lineares e cíclicos. O endocarpo é formado por tecido esclerificado contendo substâncias resinosas que se volatilizam com o calor, substâncias azotadas, matérias gordas e polifenóis. Encerra a amêndoa, rica em albume celulósico e azeite de sabor doce e cor amarelada. Quanto ao mesocarpo, parte carnuda do fruto, é o último a formar-se, após o epicarpo e o endocarpo (Baer, 2006).

Os principais constituintes da polpa das azeitonas são a água e o azeite. Seguem em importância quantitativa os glúcidos, em especial os monossacáridos e oligossacáridos livres. Os principais açúcares são a glucose, a frutose, o manitol, a sacarose e também, com menos importância, a xilose e a ramnose (Baer, 2006).

De acordo com o mesmo autor, outro constituinte com algum significado é a fibra, constituída essencialmente por celulose, lenhina e hemiceluloses. As substâncias pécticas representam 0,3% a 0,6% da polpa fresca e contêm principalmente ácido anidro-galacturónico, grupos carboxilo esterificados e acetilos.

Ainda segundo Baer, (2006), as proteínas representam 1% a 3% da polpa e são constituídas por todos os aminoácidos conhecidos, avultando a arginina que representa 25% do total, seguida da leucina e valina e dos ácidos espártico e glutâmico.

Os ácidos orgânicos (cítrico, málico e oxálico) podem representar 0,5% a 1,0% da polpa. São responsáveis por um pH entre 4,1 e 5,4 (Baer, 2006).

O teor de cinza na polpa varia de 0,68% a 1,10%, com predominância do potássio, ao qual se seguem, com teores bastante inferiores, fósforo, cálcio, magnésio e sódio (Baer, 2006).

A azeitona contém altas concentrações de compostos fenólicos, variando entre 1% e 3% do peso fresco. As principais classes de compostos fenólicos presentes no fruto são ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, flavonoides e secoiridoides. O (3,4-dihidróxifenil) etanol (3,4-DHPEA) e o (p-hidróxifenil) etanol (p-HPEA) são os álcoois fenólicos mais abundantes. Os flavonóides incluem glucósidos flavonólicos como a luteolina-7-

glucósido e rutina assim como antocianinas, cianidina e glucósidos de delphinidina. Enquanto os ácidos fenólicos, álcoois fenólicos e flavonóides ocorrem em muitos frutos e vegetais os secoiridoides estão presentes exclusivamente em plantas pertencentes à família das Olearaceae que inclui a *Olea europaea* L. Os compostos fenólicos classificados como secoiridoides caracterizam-se pela presença de ácido elenólico ou derivados deste ácido na sua estrutura molecular. A oleuropeína, dimetiloleuropeína e ligstrósido são os glucósidos de secoiridoides mais abundantes no fruto da oliveira. Ácidos fenólicos com uma estrutura química básica de C6-C1 (ácidos benzoicos) e C6-C3 (ácido cinâmico) também se encontram nas azeitonas (Servilli *et al.*, 2002).

O principal composto fenólico é a oleuropeína, presente na azeitona à razão de 20 a 1000 mg/kg de extrato seco. É um glucósido do ácido elenólico, esterificado pelo hidroxitirosol (Baer, 2006).

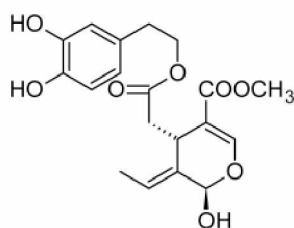


Figura 1 – Fórmula da oleuropeína (adaptado de Ribeiro, 2005)

A parte lenhosa do caroço é composta principalmente por celulose (38%), outros glúcidos (14%), água (9%), proteínas (30%), cinza (4%) e uma pequena percentagem de azeite (<1%) (Baer, 2006).

2.1.2 – Crescimento e maturação

O período de crescimento, desenvolvimento e amadurecimento da azeitona é prolongado, variando com a cultivar, práticas culturais, nível de colheita das árvores, condições climáticas, entre outros (Mailer *et al.*, 2005). No entanto e, de acordo com Hermoso *et al.* (1998), o período de maturação da azeitona pode estabelecer-se em 200 dias como valor médio.

Como na maioria das drupas, o crescimento da azeitona segue uma curva dupla sigmoidal com uma etapa de latência inicial e outra final. Durante a primeira fase, de crescimento rápido, termina a divisão celular da maior parte dos tecidos do fruto, sendo

o endocarpo o principal tecido em desenvolvimento, chegando a ocupar 80% do volume do fruto. Na fase II, de crescimento lento, o endocarpo endurece progressivamente e, tanto o embrião como o caroço, alcançam o seu tamanho final. A fase III, de crescimento rápido devido ao aumento do tamanho das células da polpa, determina o tamanho real do fruto. Nesta fase inicia-se a biossíntese do azeite e a sua acumulação (Hermoso *et al.*, 1998).

No início do Outono a cor verde intensa transforma-se em verde claro, depois em verde amarelado brilhante. Continuando, começam a aparecer manchas violáceas, principalmente no ápice, que se estendem e acabam por ocupar todo o epicarpo, penetrando finalmente até ao caroço. Entretanto o epicarpo também mudou de cor, desde o violáceo até ao violeta escuro brilhante, cobrindo-se de uma camada esbranquiçada de pruína. As cores finais, tanto na polpa como na pele do fruto, adquirem as tonalidades características de cada cultivar (Baer, 2006).

Considera-se como período de maturação o tempo que vai desde o surgimento das manchas violáceas até à coloração definitiva da pele e da polpa. Na maioria das cultivares estas últimas transformações não acontecem em todos os frutos ao mesmo tempo, alcançando-se a maturação de uma forma escalonada (Baer, 2006).

A maturação da azeitona ocorre durante um período de vários meses. A acumulação de azeite começa cerca de 40 a 50 dias após a floração e continua, rapidamente, até ao amadurecimento do fruto; depois abranda mas não para. Durante o processo de maturação dão-se várias alterações no fruto, tanto físicas como químicas. Estas alterações variam de acordo com a cultivar, clima e condições de crescimento da azeitona: o perfil dos ácidos gordos modifica-se, o teor de polifenóis diminui, o perfil de polifenóis altera-se e o teor de clorofila reduz-se. As alterações nestes componentes são comercialmente relevantes uma vez que têm um efeito significativo na estabilidade e nas características sensoriais dos azeites extraídos (Ayton, 1995).

2.1.3 – Cultivares

2.1.3.1 – Arbequina

A variedade “Arbequina” é a mais importante da Catalunha sendo esta a sua principal área de cultivo, podendo também ser encontrada fora de Espanha, nomeadamente na Argentina e em Portugal, principalmente no Alentejo.

É uma variedade muito resistente ao frio, de vigor reduzido o que permite a sua utilização em olivais intensivos e superintensivos. É muito apreciada pela sua precoce entrada em produção, elevada produtividade, bom rendimento de gordura e excelente qualidade do seu azeite, apesar da sua baixa estabilidade. Segundo Granados (2000), esta variedade é utilizada principalmente para transformação em lagar pois apresenta distintas características organoléticas, sendo recomendado para o tempero de saladas e verduras.

O azeite é muito equilibrado, aromático e frutado, com um sabor amanteigado, doce, com notas de ervas, nozes, amêndoa verde, maçã e alcachofra. Quanto à sua composição intrínseca, a Arbequina possui um conteúdo médio-baixo em ácido oleico, rico em ácido palmítico e em ácidos gordos polinsaturados que lhe dão a sua fluidez característica. Destaca-se o seu teor médio em vitamina E (α - tocoferol) e baixo teor de compostos fenólicos totais, o que lhe dá suavidade e doçura. Como são azeites muito sensíveis à oxidação, após o embalamento devem ser mantidos ao abrigo da luz e de temperaturas elevadas (Rossini, 2014).

2.1.3.2 – Arbosana

A variedade “Arbosana” é de origem espanhola, utilizada em plantações superintensivas, e atualmente está-se a difundir por todo o país e noutros países de vários continentes, incluindo Portugal (Rossini, 2014).

Oliveira com pequena estatura, mas de alto rendimento em azeite (19-20%), têm uma maturação tardia e tendência à bi-anulidade. É resistente ao frio. O azeite é medianamente frutado, com um toque distinto de tomate maduro, chá de camomila ou de ervas. Um azeite picante e levemente amargo, ideal para acompanhar todos os tipos de massa, saladas e, em geral, comida com sabor forte (Rossini, 2014). De acordo com

Huguet (2010), possui um conteúdo médio-alto em ácido oleico, médio em ácido palmítico e médio-baixo em ácido linoleico.

2.1.3.3 – Kororeiki

A variedade “Koroneiki” é procedente da Grécia e a principal variedade neste país, ocupa 50-60% da superfície de olival. Por ser uma das variedades utilizadas nas plantações superintensivas está-se a plantar além deste em muitos outros países de vários continentes (Rossini, 2014), incluindo nos novos olivais intensivos e super-intensivos na região do Alentejo.

É uma árvore de vigor médio e de porte aberto, produtividade muito alta, rendimento de azeite aproximadamente de 20% e a qualidade de azeite excelente. É resistente à seca, mas não tolera frio muito intenso. O fruto amadurece cedo (Rossini, 2014).

O azeite é muito agradável, rico em ácido oleico, médio em ácido palmítico e médio-baixo em ácido linoleico. Devido ao baixo teor em ácidos gordos polinsaturados e ao teor relativamente elevado em compostos fenólicos é muito estável (Huguet, 2010). É um azeite com uma personalidade forte, ligeiramente amanteigado, intensamente aromático e frutado, com notas de tomate verde e maçã, apresentando notas amargas e picantes. É ideal para as refeições feitas com especiarias, saladas amargas e peixe como salmão (Rossini, 2014).

2.2 – O Azeite Virgem

O azeite forma-se principalmente nas células da polpa da azeitona, em pequenas gotículas rodeadas por uma biomembrana protetora, durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto. O azeite, assim formado pela natureza, constitui uma reserva energética para a azeitona fazer face a períodos de crise, quando se liberta da planta mãe, para germinar e dar origem a uma nova planta (Ribeiro, 2005).

De acordo com o Regulamento (UE) nº. 1348/13 do Conselho de 16 de Dezembro de 2013, anexo I), o azeite virgem é obtido a partir do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos, em condições que não alterem o azeite, e que não tenham sofrido outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação e da filtração, com exclusão dos azeites obtidos com solventes, com

adjuvantes de ação química ou bioquímica ou por processos de reesterificação, bem como de qualquer mistura com óleos de outra natureza.

Classificação:

Azeite Virgem Extra: azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,8g por 100g, estando as outras características conformes com as previstas para esta categoria.

Azeite Virgem: azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 2g por 100g, estando as outras características conformes com as previstas para esta categoria.

Azeite Virgem Lampante: azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, superior a 2g por 100g e/ou estando as outras características conformes com as previstas para esta categoria.

2.2.1 – Composição química

O azeite é considerado um produto que possui vastas propriedades nutricionais as quais se encontram intimamente relacionadas com a sua complexa composição química. É de salientar que os fatores agronômicos, tais como a rega, a fertilização, a poda, as práticas agrícolas relacionadas com a produção, a colheita, o transporte e o armazenamento da azeitona, assim como, os fatores geográficos e climáticos, a variedade e o estado de maturação da azeitona podem ter uma influência bastante significativa na composição química do azeite. Outros fatores que poderão ainda provocar alterações na composição química do azeite são os que se encontram relacionados com a obtenção deste produto, tais como o método de extração utilizado e o tipo de equipamentos, assim como, as condições de transporte e armazenamento (Dias, 2009).

Quimicamente, os componentes do azeite podem dividir-se, em duas frações, uma saponificável, a qual permite a formação de sabões (sais de sódio e/ou potássio) por hidrólise em meio alcalino e, outra, insaponificável. A fração saponificável constitui cerca de 97 a 99% do peso total do azeite, sendo composta maioritariamente por triacilgliceróis e uma pequena fração de di e mono gliceróis, fosfolípidos e de ácidos gordos livres, os quais são responsáveis pela acidez do azeite. A fração insaponificável é solúvel em água e representa cerca de 2% da massa total de azeite sendo composta por

um conjunto muito variado de substâncias tais como ceras, álcoois alifáticos, hidrocarbonetos, pigmentos, compostos fenólicos, vitaminas, esteróis, tocoferóis, compostos voláteis e aromáticos. Apesar de constituírem a fração minoritária no azeite, a presença destas substâncias tem elevada importância, tanto do ponto de vista nutricional como em aspetos relacionados com a estabilidade e a qualidade organolética do produto final. Dada a sua elevada especificidade, os componentes minoritários são muitas vezes usados como critério de qualidade e de autenticidade [Boskou, 1998; Garcia *et al.*, 2005].

A riqueza nutricional do azeite tem sido alvo de detalhados estudos por parte da comunidade científica que se dedica a esta área do conhecimento. Sob o ponto de vista nutricional, estes estudos têm vindo a permitir a obtenção de um maior conhecimento sobre a composição química do azeite e a sua relação com as propriedades biológicas que este produto apresenta. Em particular, é de salientar o relevante papel desempenhado pelos ácidos gordos monoinsaturados os quais ajudam a baixar os níveis plasmáticos de LDL-colesterol (“Low-density lipoprotein”) e a elevar os níveis correspondentes de HDL-colesterol (“High-density lipoprotein”), o que favorece o sistema cardiovascular. Outras substâncias também presentes no azeite, tais como a vitamina E e os compostos fenólicos desempenham um papel crucial na função antioxidante. Além da função antioxidante, os compostos fenólicos apresentam uma ação-inflamatória e anticoagulante, prevenindo o aparecimento do cancro do colón e da osteoporose (Cunha, 2007).

Nas seções seguintes será discutida em detalhe a composição química da fração saponificável e insaponificável do azeite e de que forma os componentes dessas frações se encontram relacionados com alguns parâmetros da qualidade que serão objeto de estudo no âmbito do presente trabalho.

2.2.1.1 – Fração saponificável

Esta fração do azeite é constituída essencialmente por triacilgliceróis e ácidos gordos livres.

Segundo Curci (2001), os ácidos gordos que constituem os triacilgliceróis do azeite apresentam uma certa variabilidade, de acordo com a região de proveniência, havendo,

no entanto, uma clara prevalência do ácido oleico. Os limites da composição ácida, fixados pelo Conselho Oleícola Internacional são os seguintes:

- Ácido palmítico (C16:0): 7,5-20%
- Ácido palmitoleico (C16:1): 0,3-3,5%
- Ácido esteárico (C18:0): 0,5-5%
- Ácido oleico (C18:1): 55,0-83,0%
- Ácido linoleico (C18:2): 3,5-21%
- Ácido linolénico (C18:3): 0,1-1,5%

O facto de o azeite virgem ser constituído, maioritariamente, por ácido oleico faz com que ocupe uma posição ímpar, relativamente aos outros óleos vegetais, uma vez que este ácido é menos suscetível à oxidação do que os ácidos linoleico e linolénico (Owen *et al.*, 2000).

Os triacilgliceróis do azeite apresentam várias insaturações nas cadeias dos ácidos gordos. Essas insaturações tornam as estruturas hidrocarbonadas mais suscetíveis à oxidação pelo oxigénio e favorecem a produção de compostos voláteis secundários, de aroma e sabor desagradáveis (Henriques, s/d).

A produção de ácidos gordos polinsaturados pela azeitona, como por exemplo o ácido linoleico, que é especialmente propício à reação de oxidação, tende a ser superior em azeites provenientes das regiões mais quentes do sul da zona mediterrânica, em relação a azeites de outras áreas (Owen *et al.*, 2000).

A maior parte dos ácidos gordos do azeite estão presentes na estrutura dos triacilgliceróis, sendo os três principais triacilgliceróis os OOO (43,5%), POO (18,4%) e OOL (6,8%), onde O representa o ácido oleico, P o ácido palmítico e L o ácido linoleico (Kiritsakis *et al.*, 2000).

Devido ao facto do ácido oleico ser o ácido gordo de maior relevo no azeite, existe uma grande predominância do triacilglicerol trioleína (OOO) sobre os demais triacilgliceróis existentes (Baer, 2006).

Os ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados situam-se, predominantemente, na posição β dos glicéridos e os restantes distribuem-se nas posições α e α' (Baer, 2006).

2.2.1.2 – Fração insaponificável

Esta fração do azeite, solúvel em água, é a principal responsável pelo valor biológico e nutricional do azeite, pelas características organoléticas e, ainda, pela sua resistência à oxidação (Baer, 2006).

Os principais compostos que integram o grupo dos componentes menores do azeite são:

Álcoois alifáticos: os álcoois alifáticos, de 22 a 28 átomos de carbono, estão presentes no azeite em quantidades muito pequenas e podem derivar dos ácidos gordos por conversão do grupo carboxilo e hidroximetilénico. Álcoois até 22 átomos de carbono são álcoois gordos e os de cadeia hidrocarbonada mais longa são álcoois cerosos (Baer, 2006).

Ceras: são ésteres de um álcool alifático monovalente superior com um ácido gordo de alto peso molecular e encontram-se no azeite em pequena quantidade, provenientes dos tegumentos das sementes e epicarpos dos frutos. Durante a conservação do azeite, as ceras decompõem-se por hidrólise, encontrando-se, assim, álcoois livres na fração insaponificável (Curci, 2001).

Compostos fenólicos: compostos fenólicos ou polifenóis é o termo usado na literatura para definir aquelas substâncias que possuem um anel de benzeno ligado a um ou mais grupos hidroxílicos (ésteres, metil ésteres, glucósidos, entre outros). A maior parte dos compostos fenólicos encontra-se na natureza numa forma conjugada, principalmente com uma molécula de açúcar, e estão relacionadas com a qualidade sensorial e nutricional dos vegetais frescos e processados devido à formação/ alteração da cor e do “flavour” e à perda de nutrientes. As alterações oxidativas dos polifenóis não são sempre indesejáveis e podem contribuir positivamente para o aroma e “flavour” dos alimentos. A atividade anti-oxidante destes compostos é de grande interesse para a indústria alimentar (Tsimidou, 1998).

O azeite é o único óleo vegetal com quantidades apreciáveis de substâncias fenólicas naturais, que lhe confere o gosto amargo e frutado e contribuem, em grande parte, para a sua resistência à oxidação (Baer, 2006).

A composição fenólica do azeite virgem é afetada pelo método de extração e também por parâmetros agronómicos como a cultivar, condições climáticas, maturação do fruto

e estado sanitário das azeitonas (Stefano *et al.*, 1999). Servilli *et al.* (2002) referem que a concentração fenólica do azeite virgem parece ser grandemente afetada pela disposição e distribuição de água durante o ciclo vegetativo da oliveira.

Dependendo de fatores como estes, a concentração de compostos fenólicos no azeite pode variar entre 50 e 800 mg/kg (Gutfinger, 1981).

Teoricamente, os compostos fenólicos não estão livres nas eterificados ou esterificados nos glucósidos. Reações naturais de oxidação e de hidrólise que ocorrem nos frutos têm como consequência a libertação dos fenóis (Baer, 2006).

Os fenóis livres, presentes no azeite ou na água de vegetação, são muito numerosos: fenóis ácidos mono, di e trihidroxilados e fenóis neutros como ésteres e éteres. Os mais conhecidos são as tetrahidroxiflavonas, luteolina, apigenina e glucósidos; os ácidos cinâmicos e seus derivados, ácido cafeico (3,4-dihidroxicinâmico), ácido p-cumárico e verbascosido; os ácidos fenólicos, vanílico, p-hidroxibenzóico, sirínico (4-hidroxifeniletanol) e hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol), que são os mais abundantes e caraterísticos do azeite virgem (Baer, 2006).

A composição qualitativa e quantitativa dos fenóis hidrofílicos é fortemente afetada pelas condições agronómicas e tecnológicas da produção Servilli *et al.* (2002).

O último grupo de fenóis encontrados no azeite são os lignanos, sendo o (+)-1-pinoresinol e o (+)1-hidroxipinoresinol, os lignanos mais frequentes Servilli *et al.* (2002).

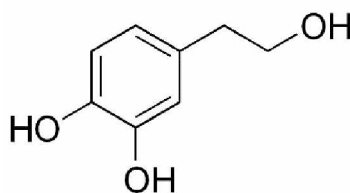


Figura 2 – Fórmula do hidroxitirosol (adaptado de Ribeiro, 2005)

Fosfolípidos: os fosfolípidos fazem parte da constituição das membranas e dos transportadores das lipoproteínas, sendo os mais conhecidos a lecitina e a cefalina. Estão presentes em pequena quantidade no azeite (Baer, 2006).

Hidrocarbonetos: formam-se como produtos colaterais durante a síntese dos ácidos gordos e compreendem o esqualeno (12 a 75% do total do insaponificável) e o β -caroteno, de ação vitamínica A e antioxidante com teores variáveis (0,3 a 3,7 mg/kg). O azeite contém a maior quantidade de esqualeno de todos os óleos vegetais, sendo este composto um precursor bioquímico dos esteróis (Baer, 2006).

Pigmentos: as substâncias corantes são representadas pelos carotenoides e pelas clorofilas. Os carotenoides são polisoprenóides de hidrocarbonetos, álcoois ou ácidos carboxílicos e são solúveis nos óleos. Contém um número considerável de ligações duplas conjugadas, o que lhes confere a cor amarela, laranja ou vermelha. Compreendem quatro grupos principais: os carotenos (hidrocarbonetos da série C₄₀), as xanofilas (derivados hidroxilados ou cetónicos) e, ainda, os ácidos carotenoides e os ésteres xantofílicos. Os carotenoides mais importantes são o α , o β , β -carotenos e o licopeno, todos com a fórmula molecular C₄₀H₅₆ (Baer, 2006).

Os pigmentos verdes do azeite identificam-se como clorofilas. Contém o chamado núcleo porfirínico, com um átomo de magnésio no centro. Este núcleo é constituído por quatro anéis pirrólicos azotados, complexados com magnésio e, ainda, com dois grupos éster. As clorofilas apresentam-se nas formas a e b, que se degradam com certa facilidade, dando lugar às respetivas feofitinas a e b (Baer, 2006).

A clorofila apresenta uma coloração verde tanto mais intensa quanto menos avançado é o estado de maturação das azeitonas. No entanto, durante a conservação do azeite a clorofila degrada-se perdendo o azeite a cor verde e tornando-se mais amarelado. Na ausência de luz a clorofila tem uma ação anti-oxidante, atuando em sinergia com os compostos fenólicos e inibindo a etapa inicial da auto-oxidação (Méndez, 2007). Na presença de luz, mesmo que difusa, tem uma ação pró-oxidante, uma vez que tem a capacidade de transferir energia da luz para o oxigénio que reage com os ácidos gordos insaturados, acelerando a oxidação. Os carotenoides são responsáveis pela cor amarelo/alaranjado do azeite. São geralmente inibidores da foto-oxidação, aceitando energia do oxigénio singulet. O carotenoide mais abundante no azeite virgem é o β -caroteno (Curci, 2001).

Os carotenoides são compostos lipossolúveis sensíveis à luz e ao oxigénio. Na ausência destes fatores, os carotenoides são estáveis nos alimentos, mesmo a temperaturas

elevadas. A sua degradação é acelerada pelos radicais livres que se formam durante a oxidação lipídica (Silva, 2008). De realçar a importância dos carotenos na alimentação devido à sua atividade como provitamina A.

A cor do azeite virgem pode assim variar entre o dourado claro e o verde intenso, dependendo da combinação e da proporção entre os pigmentos clorofilinos e carotenoides.

Substâncias de natureza terpénica e esteróica: as substâncias de natureza terpénica e esteróica podem ter a mesma origem: o esqualeno, de que derivam, por ciclização, as aminas que, por sua vez, se transformam em álcoois bifuncionais, eritrodiol e uvaol. O último termo da sequência é representado pelos ácidos triterpénicos pentacíclicos: ácidos oleanólico, maslínico, ursálico, dioxiursálico e betulínico. A ciclização do esqualeno conduz também aos álcoois triterpénicos tetracíclicos, cujas transformações sucessivas, essencialmente dimetilações, conduzem aos esteróis (Baer, 2006).

De acordo com o mesmo autor, os esteróis são álcoois superiores monovalentes, sendo os seus principais representantes o β -sitosterol e também o campesterol e o estigmasterol e, ainda, colesterol, campestanol, 7-campestanol, 5,23-estigmastadienol, clerosterol, 5-avenasterol, 5,24-estigmastadienol, 7-estigmastenol e 7-avenasterol. Os álcoois triterpénicos representam 10% da fração insaponificável.

Substâncias responsáveis pelo cheiro e sabor: a fragância e o sabor caraterísticos do azeite devem-se a um certo número de compostos voláteis e alguns compostos fenólicos, muitos dos quais normalmente presentes numa concentração baixa. Até à data foram identificados, por vários autores, mais de uma centena e meia de compostos do aroma do azeite, de natureza química muito variada, entre os quais se encontram hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, ésteres, fenóis, derivados do fenol, terpenos oxigenados e derivados do furano. Porém, os compostos realmente responsáveis pelas notas olfativas caraterísticas do azeite representam apenas uma fração do total destes compostos. De fato, se por um lado nem todos os compostos identificados têm odor, por outro lado alguns destes compostos foram encontrados no azeite em concentração tão baixa que se supõe que a sua contribuição para o aroma global seja pequena (Ribeiro, 2005).

A formação destes compostos dá-se principalmente nos cloroplastos. Quando a membrana lipiproteica, que cobre as gotas de azeite, entra em contato com os cloroplastos, os compostos voláteis ligam-se ao substrato lipídico (Baer, 2006).

Tocoferóis: os tocoferóis são antioxidantes de natureza fenólica, quase sempre na forma livre, mas podendo apresentar-se sob a forma esterificada com um ácido gordo. Embora na forma esterificada a sua solubilidade aumente nas gorduras, perdem, contudo toda a atividade como antioxidantes. Os tocoferóis (α , β , γ e δ), além de terem atividade anti-oxígena, têm também atividade vitamínica. A sua atividade vitamínica E decresce pela ordem apresentada. O mais ativo é o α -tocoferol composto por um núcleo hidroxicromano, com um grupo hidroxilo fenólico responsável pela atividade antioxidígena, e com uma cadeia hidrocarbonada lateral saturada de 16 átomos de carbono. Possui três grupos metilo fixados no núcleo hidroxicromano, enquanto que o β e o γ só têm dois e o δ um só. O α -tocoferol representa cerca de 95% do total dos tocoferóis. No azeite virgem, o conteúdo em tocoferol varia entre os 125 e os 200 ppm (Baer, 2006).

Vitaminas: as vitaminas lipossolúveis também estão presentes no azeite em concentrações importantes. As principais são a vitamina A ou retinol, a vitamina D ou calciferol, nas duas variantes D₂ e D₃, a vitamina E ou α -tocoferol e a vitamina K (Baer, 2006).

2.2.2 – Qualidade do azeite

Em termos genéricos, a qualidade de um produto pode ser definida pelo conjunto de características intrínsecas, as quais permitirão a sua diferenciação como melhor ou pior comparativamente com os outros produtos do mesmo tipo (Granados, 2000). Assim, a garantia de qualidade de um dado produto reveste-se da maior importância pois pode ser considerado como um fator fundamental para o aumento da confiança por parte do consumidor e consequente fidelização no consumo de determinado produto.

Em particular para o azeite virgem, a sua qualidade é um aspeto complexo do ponto de vista comercial uma vez que deverá ser tida em conta a vertente nutricional assim como a organolética. No que respeita ao valor nutricional, a presença de elevados teores de ácido oleico assim como de outros componentes minoritários referidos anteriormente representa uma significativa contribuição para as propriedades biológicas do azeite,

enquanto que, os compostos voláteis, também referidos anteriormente como componentes da fração insaponificável e presentes em concentrações diminutas, são os que apresentam uma maior contribuição para o cheiro e flavour únicos que o azeite nos proporciona.

O reconhecido valor nutritivo do azeite aliado às marcantes propriedades organoléticas conduziu ao aumento do seu consumo nas regiões mediterrânicas assim como à sua expansão a outras regiões do mundo, tendo como consequência o progressivo aumento do cultivo de oliveiras fora da região tradicional de produção (área mediterrânea). Contudo, é de salientar que a adaptabilidade das variedades, as diferentes condições climáticas e as práticas agrícolas podem também alterar a composição química do azeite e, inevitavelmente, a sua qualidade (Kalua *et al.*, 2007).

Assim, a qualidade deste produto de elevado valor económico encontra-se dependente de vários fatores que englobam tanto o processo de extração como o do armazenamento. Em concreto, o estabelecimento de normas comerciais e alimentares que garantam ao consumidor um produto de qualidade revestem-se de uma importância crucial para assegurar a “qualidade alimentar” deste tipo de produto. Assim, o conhecimento das propriedades físico-químicas e organoléticas do produto e dos parâmetros que determinam as suas características são fundamentais para avaliar a sua qualidade.

2.2.3 – Reações de degradação

Os dois principais fenómenos químicos que conduzem à deterioração do azeite virgem são a hidrólise, que no caso específico do azeite é designada por lipólise e a oxidação. Enquanto a lipólise ocorre essencialmente ao nível do fruto (azeitona), a oxidação apresenta uma maior expressão durante a fase da extração e do armazenamento (Kiritsakis, 1992).

As reações de degradação do azeite anteriormente referidas provocam alterações na composição química deste tipo de produto pelo que as suas características sensoriais e propriedade nutritivas sofrem também modificações que poderão ser relativamente significativas. O ranço surge como um dos principais fenómenos associados à deterioração do azeite (Santos, 2009).

A lipólise é uma reação de hidrólise dos triacilgliceróis que conduz à libertação de ácidos gordos livres, sendo responsável pelo aumento da percentagem de acidez do azeite. Os principais fatores que promovem estas reações de hidrólise são a humidade e a temperatura (Kiritsakis, 1992; Gouveia, 1995).

Existem dois tipos de lipólise, a microbiana que tal como o nome indica é promovida por microrganismos (leveduras, fungos, bactérias) presentes nas azeitonas e a enzimática que é conduzida pelas enzimas naturais da azeitona – as lípases (Kiritsakis, 1992).

O fenómeno de deterioração oxidativa ocorre quando o azeite entra em contato com o oxigénio, apesar de existirem substâncias presentes no tecido celular da planta que podem retardar a oxidação, os antioxidantes. Em concreto, durante este processo ocorre uma reação entre os ácidos gordos insaturados, presentes no azeite e o oxigénio pelo que a oxidação do azeite conduz à diminuição dos teores dos ácidos linoleico e linolénico e algumas vitaminas lipossolúveis (Aparício e Harwood, 2003).

Segundo Velasco e Dobarganes (2002), a composição em ácidos gordos do azeite em que existe um elevado rácio entre os ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados ou ácido oleico/ ácido linoleico, aliada ao fato de existirem uma grande variedade de componentes minoritários com propriedades antioxidantes (p. ex: polifenóis, tocoferóis e carotenoides) contribui de forma muito significativa para a resistência à deterioração oxidativa que o azeite apresenta.

Em suma, o processo de oxidação do azeite é favorecido por diversos fatores, tais como:

- Contato com o oxigénio – inicialmente processo é lento devido à presença de antioxidantes, mas quando atingido um determinado nível de peróxidos a velocidade da reação acelera e surge o cheiro a ranço.
- Temperatura – acelera a oxidação favorecendo a formação de peróxidos e, posterior, decomposição em aldeídos e cetonas.
- Luz – favorece a reação do azeite com o oxigénio.
- Presença de metais – produzem um efeito catalisador da oxidação, apesar de estarem presentes em quantidades diminutas, conferindo ao azeite um sabor metálico (Villalta, 1999).

De uma forma geral, o mecanismo da auto-oxidação envolve três etapas distintas: iniciação, propagação e finalização ou término (Ferreira, 2012), que englobam fundamentalmente reações radiculares. O processo global encontra-se representado esquematicamente na figura 3.

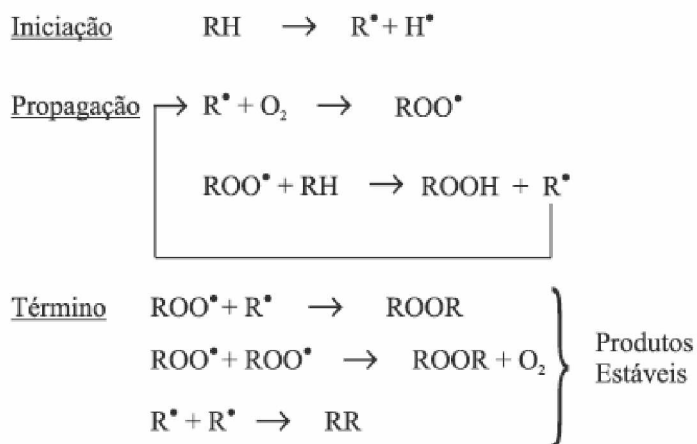


Figura 3 - Representação geral do mecanismo da oxidação lipídica (Ramalho *et al.*, 2006).

De acordo com a figura 2, na fase da iniciação ocorre a formação de radicais livres do ácido gordo (R^{\bullet}), a qual é favorecida por fatores como a luz e o calor. Na etapa subsequente, estes radicais livres que são muito reativos em presença do oxigénio atmosférico são convertidos noutros radicais surgindo, nesta fase, os produtos de oxidação primários (peróxidos ROO^{\bullet} e hidroperóxidos $ROOH$). É de salientar que os radicais livres formados atuam como propagadores da reação. Por último, a auto-oxidação é finalizada com a ocorrência de reações entre os diferentes radicais levando à formação de produtos estáveis denominados por produtos secundários da oxidação, responsáveis pelo cheiro e sabor a ranço (Ferreira, 2012).

Em suma, o processo de deterioração pode seguir a via enzimática (designado por lipólise) ou química sendo que, neste caso, as reações podem ocorrer na ausência ou na presença de luz, sendo denominadas por auto-oxidação e foto-oxidação, respetivamente.

2.2.3.1 – Foto-oxidação

Os azeites possuem na sua constituição compostos sensíveis à luz, denominados por fotossensíveis, que se ativam quando expostos a este parâmetro. Quando o azeite é exposto à luz pode ocorrer a formação de hidroperóxidos através de reações de foto-

oxidação ou de auto-oxidação fotolítica, sendo este fenómeno também observado quando o azeite está em contacto com o oxigénio (Aparício e Harwood, 2003).

Em concreto, o efeito da luz é exercido através de compostos minoritários do azeite que atuam como fotosensibilizadores, tais como clorofila, riboflavina que podem ser eletronicamente excitados por absorção da energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível transferindo-a, em seguida, para a molécula de oxigénio ($^3\text{O}_2$) produzindo o estado de singleto ($^1\text{O}_2$). Esta molécula reage diretamente com as ligações duplas dos ácidos gordos formando hidroperóxidos que, por posterior degradação, originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (Ferreira, 2012; Kalua et al., 2007). Assim, a proteção do azeite da luz direta é essencial para assegurar a sua qualidade (Pristouri *et al.*, 2010). É de salientar que a exposição dos azeites à luz ocorre com maior significado durante a etapa da distribuição comercial.

Nos últimos anos, a influência do parâmetro luz na qualidade dos azeites tem sido alvo de diversos trabalhos de investigação, os quais incidiram fundamentalmente no estudo da variação dos parâmetros químicos da qualidade (Pagliarini *et al.*, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2002; Caponio *et al.*, 2005; Kalua *et al.*, 2006; Vekiari *et al.*, 2007, Pristouri *et al.*, 2010). Contudo, alguns desses estudos têm sido também estendidos à determinação da variação dos teores de componentes minoritários do azeite, tais como tocoferóis, carotenóides e clorofilas (Caponio *et al.*, 2005; Del Caro *et al.*, 2006) assim como de compostos voláteis e vitaminas (Messina *et al.*, 2009). Os estudos desenvolvidos por Caponio *et al.*, (2005) e por Vekiari *et al.*, (2007) evidenciaram que o tempo de vida útil dos azeites expostos a intensa luz artificial e luz difusa é relativamente mais curta do que para os azeites armazenados no escuro. As investigações de Torres *et al.* (2006) sobre o efeito da luz na composição química de azeite virgem da variedade Arbequina incidiram ainda nas condições de armazenamento, nomeadamente nos tipos de contentores utilizados para o armazenamento.

2.3 – Tecnologia de extração de Azeite Virgem

Neste capítulo será descrito, sucintamente, o método de extração centrífugo de duas fases, por ser o utilizado na grande maioria dos lagares nacionais e também no lagar onde decorreram os ensaios experimentais e se obtiveram as amostras de azeite virgem para o presente trabalho.

2.3.1 – Método contínuo de extração centrífugo de duas fases

De acordo com o Conselho Oleícola Internacional (COI, 1991), a utilização dos sistemas de extração contínuos centrífugos de 3 e de 2 fases, podem influenciar as características químicas e organoléticas dos azeites obtidos devido a fatores do processo de extração tais como: temperatura e caudal da água de fluidificação da massa na bateadeira; caudal de injeção de massa ou velocidade de rotação do decanter, entre outros.

Os sistemas de extração contínuos não necessitam de paragens, uma vez que possuem bombas mono a fornecer continuamente a massa proveniente da bateadeira para o decanter ou centrífuga horizontal, com a possibilidade de variação do caudal. A massa da azeitona ao ser sujeita a uma força centrífuga horizontal onde os valores do fator G se situam entre 2500 e 4000 rpm, faz com que a diferença de densidades dos componentes da massa forme anéis distintos. Os componentes sólidos, mais densos, ocupam a parte exterior. A água de vegetação, com densidade intermédia, colocar-se-á a seguir e o azeite com densidade mais baixa irá colocar-se na zona mais próxima do eixo (Harwood *et al.*, 2003; Civantos, 2008).

O sistema contínuo centrífugo de duas fases surgiu nos anos 90 do século XX e tem como produtos finais azeite virgem e bagaço húmido, sendo muitas vezes chamado denominado sistema de extração ecológico por não originar águas russas (Sampedro *et al.*, 2004; Aires, 2007).

É importante que o processo de extração seja realizado a frio, uma vez que na etapa de batimento da massa, onde se pretende que haja um aumento da quantidade de azeite “livre”, devido à união de gotas de azeite em gotas maiores, esta não seja sujeita a temperaturas superiores a 30°C. No caso de se utilizarem temperaturas superiores, verifica-se a perda de compostos voláteis, aumentando paralelamente o índice de peróxidos e provocando uma diminuição da estabilidade oxidativa (Harwood *et al.*, 2003). Esta etapa é, assim, de extrema importância, pois é dela que depende o rendimento e a qualidade do azeite (Civantos, 2008).

Durante as várias etapas do processo de extração é necessário evitar ao máximo a exposição à luz, ao ar, a temperaturas elevadas e a materiais pró-oxidantes, que acelerem os oxidativos no azeite (COI, 1991).

Em todos os processos de extração há uma fase inicial comum, em que a azeitona é submetida a uma operação de limpeza e lavagem. Ao chegar ao lagar, a azeitona é descarregada num pátio de receção sobre uma grelha, para impedir a entrada de elementos grosseiros, tais como ramos ou pedras de grande dimensão, que possam danificar a maquinaria. Procede-se depois à limpeza e lavagem da azeitona: a limpeza é feita através de uma corrente de ar que separa, principalmente, as folhas e a lavagem é realizada com uma corrente de água, eliminando a terra e pequenas pedras, graças a diferente densidade destes materiais (Marques, 2014).

O processo de extração requer, em primeiro lugar, que os frutos sejam dilacerados e reduzidos a uma pasta. Para isso, é necessário realizar duas operações: a moenda dos frutos e o batimento da massa. A primeira operação tem como finalidade romper o fruto, dilacerar as paredes celulares e as biomembranas das gotículas, permitindo a libertação das gotas de azeite que se encontram na polpa da azeitona. Atualmente, para esta operação, utilizam-se principalmente moinhos de martelos de dimensões reduzidas, de baixo custo e com elevada capacidade de trabalho (Marques, 2014).

A moenda é seguida pela termobatedura, operação que consiste num batimento lento e contínuo da massa de azeitona que, simultaneamente, é aquecida por circulação de água. Esta operação realiza-se nas termobatedeiras e tem a finalidade de aumentar a percentagem de azeite livre, por um lado, (favorecendo a fusão das gotículas de azeite em gotas maiores, aptas a serem separadas numa fase líquida contínua) e, por outro, rompendo a emulsão azeite/água e facilitando a separação das fases, este processo é demorado, variando de 45 a 90, minutos a uma temperatura inferior a 30 °C (Marques, 2014).

A massa de azeitona batida segue para o Decanter ou centrifuga horizontal, que permite separar a fase líquida (azeite e alguma água de vegetação) da sólida (bagaço com a água de constituição da azeitona), sem ser necessário fornecer água quente. Deste modo praticamente não se produzem águas residuais e as águas de vegetação da azeitona juntam-se ao bagaço que, como consequência, fica mais húmido (55 a 70% de humidade), apresentando uma consistência semelhante a lama (Marques, 2014; Harwood *et al.*, 2003; Civantos, 2008).

Posteriormente, a fase líquida sofre uma centrifugação, em centrífugas verticais, sendo separado o azeite da água (Aires, 2007).

Na figura 4 apresenta-se, esquematicamente, o processo de extração centrífugo de duas fases:

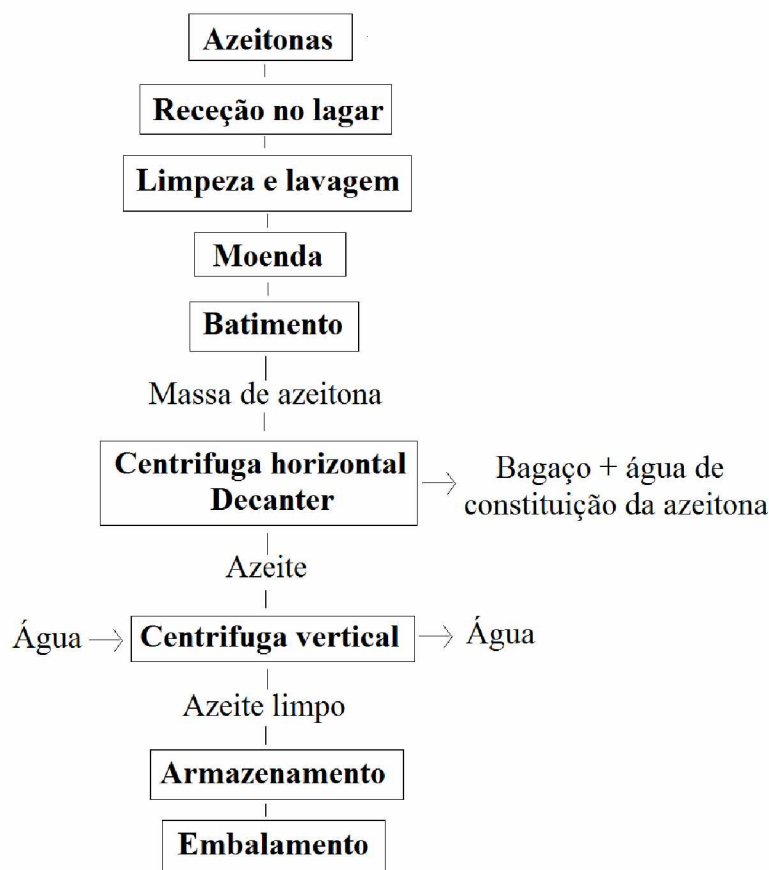


Figura 4 - Esquema do método contínuo de extração centrífugo de duas fases

2.3.2 – Moinhos utilizados na etapa da moenda

O objetivo da moenda é quebrar os frutos em pequenas partículas, permitindo a libertação do azeite.

Neste capítulo descrevem-se os dois principais tipos de moinhos mecânicos utilizados atualmente pela indústria de extração de azeite virgem e que são objeto de estudo neste trabalho: o moinho de martelos e o moinho de discos (Figura 5).

Ocorreram grandes alterações nos lagares desde que os moinhos mecânicos substituíram os tradicionais moinhos de mós e desde que os sistemas centrífugos de extração substituíram as prensas (Caponio *et al*, 2003).

De acordo com os mesmos autores, a fase mais importante do processo de extração do azeite é a preparação da massa de azeitona e, a possível utilização de diferentes equipamentos tem, inevitavelmente, repercussões no custo da eficácia do processo, na quantidade de azeite extraída e, especialmente, na qualidade do azeite virgem obtido. A opção por utilizar um moinho de martelos ou um moinho de discos na primeira etapa de preparação da massa, a moenda, depende da cultivar envolvida. O objetivo é a obtenção de um azeite virgem extra com as características organoléticas desejadas, sem prejudicar o seu tempo de prateleira. Entre os compostos minoritários do azeite virgem estão os compostos fenólicos que desempenham um papel chave no sabor amargo e pungente ou suave e doce do azeite e são também responsáveis pela resistência à oxidação e tempo de prateleira.

Os moinhos metálicos são basicamente constituídos por um corpo metálico de forma variável que gira a alta velocidade provocando o esmagamento das azeitonas contra uma superfície de metal que está fixa, possuindo aberturas adequadas, de diâmetro selecionado para reduzir finamente a polpa. Os moinhos metálicos podem ser de martelos ou de discos. Estão equipados com dispositivos para ajustar o grau de finura da polpa moída, obtendo-se o tamanho mais adequado em relação ao sistema de extração implementado (COI, 1990).

As vantagens do moinho metálico são as seguintes:

- Alta capacidade horária;
- Trabalho contínuo e automático.
- Custo e dimensões reduzidas.

No entanto, este tipo de moinho ainda apresenta alguns inconvenientes, nomeadamente:

- Esmagamento rápido e violento que não promove uma quebra satisfatória das células.
- Risco de formação de emulsões.
- Desgaste das partes metálicas, devido à velocidade de rotação.
- Aumento da temperatura.

Moinho de martelos

O moinho é alimentado através de um curto conjunto de parafuso transportador, que leva as azeitonas para a zona de martelos rotativos, equipado com placas de metal resistentes ao desgaste. O diâmetro dos orifícios da grelha/ crivo determinam a espessura da pasta da azeitona e pode-se optar pelos diâmetros standard de 5, 6 e 7 mm, de acordo com a cultivar e com o estado de maturação das azeitonas. Após passar a grelha/ crivo, a pasta cai numa cavidade em funil que a transporta para a batedora por ação de uma bomba de pistão. A velocidade de rotação varia entre 1500 de 3000 rpm, dependendo do modelo selecionado. (Alfa Laval, 2015).

Moinho de discos

O moinho é alimentado através de um curto conjunto de parafuso transportador, que leva as azeitonas para a zona entre os dois discos dentados de intervalo ajustável, sendo um fixo e um outro rotativo. Após a moenda das azeitonas através dos discos, a pasta cai numa cavidade em funil que a transporta para batedora por ação de uma bomba de pistão. A velocidade de rotação é de cerca de 1400 rpm (Alfa Laval, 2015).



Figura 5 - Moinhos de discos e de martelos (Alfa Laval, 2015)

2.3.3 – Armazenamento e Embalamento

A garantia da qualidade do azeite é uma das maiores preocupações da indústria que produz e comercializa este produto. Em particular, é crucial que se consiga preservar e garantir os atributos do azeite durante o tempo que decorre desde a produção e embalagem até ao consumo (Caponio *et al.*, 2005).

Durante o armazenamento do azeite em depósitos no lagar podem ocorrer fundamentalmente dois processos oxidativos – oxidação enzimática e auto-oxidação,

pelo que, se torna essencial tomar as devidas precauções para prevenir e evitar a sua deterioração (Boskou, 1998).

Assim, durante o processo de armazenamento é necessário ter em conta algumas características que os depósitos de azeite deverão possuir, das quais se destacam (Férrandez, 1991, e Aparício e Harwood, 2003).

- Serem contruídos em materiais impermeáveis ao azeite para que este não penetre na superfície do depósito uma vez que esse fato dificultaria a sua limpeza, favorecendo possíveis alterações. Idealmente, os depósitos devem ser de aço inoxidável pois a utilização de contentores de outros tipos de metais podem ter um efeito negativo sobre algumas características sensoriais do azeite, tais como o aroma e o sabor (Villalta, 1999).
- O material usado para a construção dos depósitos deverá ser inerte, ou seja, não deve apresentar menor reatividade química pois isso poderia introduzir contaminações no azeite, transferindo para este sabores e odores estranhos, bem como substâncias catalisadoras dos processos oxidativos.
- Deve-se proteger o azeite da luz e do oxigénio, fatores que conduzem à alteração do produto.
- O azeite deve ser mantido a uma temperatura relativamente constante, entre os 15-25°C, evitando alterações bruscas de temperatura levando à perda de aromas e ocorrência de reações de oxidação.

Um outro aspeto a ter ainda em conta no armazenamento do azeite é a base dos depósitos, a qual deverá ser construída de forma a permitir a decantação das borras do azeite que se vão acumulando no fundo dos contentores (Férrandez *et al.*, 1991).

O azeite é armazenado em depósitos no lagar, antes de se proceder ao seu engarrafamento para ser depois comercializado. Nesta fase o azeite é filtrado e posteriormente engarrafonado ou engarrafado, usualmente em garrafas de vidro. O material de embalagem deverá ser o mais indicado para proteger o azeite dos normais processos de oxidação. Assim, cada vez mais é possível verificar a substituição das habituais garrafas de vidro transparente por garrafas de vidro escuro, com o objetivo de proteger o azeite da luz minimizando desta forma o eventual processo de degradação do azeite. Estudos recentes têm sido desenvolvidos no sentido de avaliar a viabilidade de

utilizar materiais alternativos de embalagem (por exemplo PET), que permitam conservar as características do azeite até ao momento do seu consumo (Ferreira, 2012, Pristouri *et al.*, 2010).

Como referido anteriormente, um dos fenómenos que mais contribui para a degradação do azeite durante a etapa do armazenamento é a oxidação. Assim, dada a sua importância, esta reação de degradação deverá ser controlada pelo que se torna essencial compreender os fatores externos que a afetam. De entre esses fatores destacam-se a temperatura, a luz, a concentração de oxigénio e a presença de metais uma vez que são aqueles que apresentam uma contribuição mais significativa na oxidação do azeite (Kalua et al., 2007).

Capítulo 3 – Procedimento experimental

3.1 – Apresentação da empresa

A Asoma – Lagar Santa Luzia é uma empresa dinâmica com uma equipa jovem, especializada em olivicultura, produção e embalamento de azeite virgem extra, propriedade de uma Família de Andorra.

Situada em Ferreira do Alentejo, zona de excelência para a produção de azeite, Herdade de Vilas Boas e Herdade da Saona detém cerca de 230ha de olival, das cultivares Arbequina (140ha), Arbosana (48ha) e Koroneiki (42ha) – em sistema de cultivo super intensivo e um Lagar, equipado com a última tecnologia.

O azeite é extraído por um sistema contínuo por centrifugação de duas fases, da marca Alfa Laval e modelo Y9, com capacidade de laboração de 8000 kg de azeitona / hora.

Durante a campanha inaugural 2015/2016 do Lagar Santa Luzia, foram laborados 3.000.000 de kg de azeitona e extraídos 500.000 litros de azeite. O lagar possui uma capacidade de armazenamento de aproximadamente 590.000 litros em depósitos inox.

3.2 – Delineamento

A parte experimental do trabalho foi organizada em dois ensaios e teve início no mês de Novembro no lagar Santa Luzia, com a recolha das amostras de azeite virgem para o primeiro ensaio. No primeiro ensaio as amostras de azeite virgem extraídas das cultivares Arbequina, Arbosana e Koroneiki num estado de maturação intermédio (nível 3 do Índice de Jaen) e em dias determinados, foram obtidas, cada uma, à saída da centrífuga vertical para um garrafão com capacidade de 5 litros e imediatamente transportadas e armazenadas a -20°C na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja. Após obtenção das amostras das três cultivares, cada uma delas foi dividida em 9 sub-amostras, colocadas em frascos de vidro branco transparente de 250 ml na sala de preparações do laboratório de vinho e azeite: uma inicial que foi imediatamente analisada e as restantes 8 que foram expostas à temperatura ambiente e com luz artificial contínua (6 lâmpadas fluorescentes Osram Lumilux L36 W865), entre 13 de Fevereiro e 26 de Maio de 2016. A cada 10 dias (240 horas) era retirada uma amostra para análise,

totalizando 80 dias (1920 horas) de exposição à luz artificial. Pretendeu-se saber de qual das três cultivares de azeitona se obtinha o azeite mais resistente à foto-oxidação, condição a que são normalmente sujeitos nas superfícies comerciais.

O segundo ensaio, realizado com azeites virgens extraídos da cultivar Koroneiki no mesmo lagar, pretendeu estudar a influência do equipamento utilizado no processo de extração, mais concretamente do tipo de moinho escolhido para a etapa de moenda, na composição química do azeite virgem, permitindo a escolha do equipamento de extração que vá ao encontro das necessidades dos produtores e das expectativas dos consumidores. Assim, de três lotes de azeitona Koroneiki chegadas ao lagar nos dias 3, 4 e 5 de Novembro de 2015, parte foi moída num moinho de martelos (com uma velocidade de 2800 rpm) e a outra parte de cada lote num moinho de discos (velocidade de 1400 rpm), ambos da marca Alfa Laval. Obtiveram-se, assim, para cada moinho, três amostras de azeite virgem, recolhidas à saída da centrífuga vertical para garrafas de vidro de 500 ml. As amostras foram transportadas no mesmo dia da extração para a Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja, onde ficaram armazenadas a -20°C até à data da análise.

Em ambos os ensaios foram determinados os seguintes parâmetros químicos da qualidade: percentagem de acidez, índice de peróxidos, índices espectrofotométricos (k270 e k232), pigmentos clorofilinos e carotenoides, cor e compostos fenólicos totais. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.



Figura 6 - Entrada da azeitona no tegão e saída do azeite na centrífuga vertical

3.3 - Métodos analíticos

3.3.1 – Percentagem de Acidez

A determinação da percentagem de acidez visa quantificar os ácidos gordos livres presentes nos óleos, libertados das moléculas dos triacilgliceróis, através da reação de hidrólise, sendo um indicador da degradação da gordura (Laranjeira e Ribeiro, 2011 citados por Bermejo *et al.*, 2013).

O processo baseia-se na neutralização de uma amostra dissolvida em mistura dissolvente (álcool etílico/éter dietílico), seguida de titulação dos ácidos gordos livres com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) aferida, na presença do indicador fenolftaleína.

O método da determinação da percentagem de acidez baseia-se no Regulamento (UE) nº 1348/2013, que altera o Regulamento (CEE) nº 2568/91.

A determinação da percentagem de acidez foi efetuada no Laboratório de Vinhos e Azeite (LVA) da Escola Superior Agrária.

3.3.2 – Índice de Peróxidos

Entende-se por Índice de Peróxidos (IP) a quantidade de oxigénio ativo, expresso em miliequivalentes, contida em 1 kg de óleo.

De acordo com Cuesta et al. (1991), citado por Gariso (2011), o índice de peróxidos é utilizado para avaliar a formação de hidroperóxidos, porém não distingue os vários ácidos gordos insaturados que sofreram oxidação, nem fornece informações sobre produtos da oxidação secundária.

A amostra a analisar, dissolvida em ácido acético e clorofórmio reage com uma solução de iodeto de potássio, sendo o iodo libertado titulado com uma solução-padrão de tiosulfato de sódio.

A determinação do índice de peróxidos foi efetuada com base no Regulamento (UE) nº 1348/2013, que altera o Regulamento (CEE) n. o 2568/91.

A análise foi realizada no Laboratório de Vinho e Azeite (LVA) da Escola Superior Agrária de Beja.

3.3.3 – Índices Espectrofotométricos (K_{232} e K_{270})

A determinação dos índices espectrofotométricos, por absorvência nos comprimentos de onda a 232 e 270 nm permite obter indicações sobre a qualidade de uma matéria gorda, o seu estado de conservação e as modificações devidas ao processo tecnológico (Aparício *et al.*, 2003 *citado por* Maia, 2014).

O valor das absorvências nos comprimentos de onda especificados no método são devidas à presença de sistemas diénicos e triénicos conjugados formados na segunda fase da oxidação por decomposição dos peróxidos. Os valores destas absorvências são expressos em termos de extinção específica, convencionalmente designada por k (coeficiente de extinção). O método utiliza a amostra numa concentração de 1% dissolvida em iso-octano (Alves, 2013).

A determinação dos índices espectrofotométricos foi efetuada com base no Regulamento (UE) n.º. 1348/2013.

As leituras dos índices espectrofotométricos foram efetuadas no Laboratório de Vinho e Azeite (LVA) da Escola Superior Agrária de Beja, recorrendo a um espectrofotómetro da marca HITACHI U-2000, com células de quartzo de 1cm.

3.3.4 – Pigmentos clorofilinos e carotenoides

A cor e as características cromáticas do azeite constituem parâmetros sensoriais importantes. As tonalidades esverdeadas estão associadas a maiores teores em clorofilas e as tonalidades alaranjadas aos carotenoides. Clorofilas e carotenoides tendem a decrescer progressivamente ao longo da maturação dando lugar às antocianinas (Minguez-Mosquera e Gallardo-Guerrero, 1995).

As clorofilas e carotenoides apresentam um papel importante no processo oxidativo do azeite. A clorofila funciona como antioxidante na ausência de luz e como pró-oxidante na presença de luz (Guiffrida *et al.*, 2011 *citado por* Maia, 2014).

Na determinação dos pigmentos clorofilinos e carotenoides seguiu-se o método proposto por Minguez-Mosquera *et al.*, (1991), tem como indicação dissolver e perfazer

com ciclo hexano 7,5 g de amostra num balão de 25 ml, e fazer as leituras espectrofométricas a 670 e 470 nm.

Os resultados expressam-se através das fórmulas:

$$\text{Clorofilas (mg/kg)} = \frac{(A_{670} \times 10^6)}{(613 \times 100 \times d)}$$

$$\text{Carotenoides (mg/kg)} = \frac{(A_{470} \times 10^6)}{(2000 \times 100 \times d)}$$

Em que:

A = absorvência lida.

d = espessura da célula espectrofotométrica (1 cm).

As leituras dos índices espectrofotométricos foram efetuadas no Laboratório de Vinho e Azeite (LVA) da Escola Superior Agrária de Beja, recorrendo a um espectrofotómetro da marca HITACHI U-2000, com células de quartzo de 1cm.

3.3.5 – Cor

A determinação da cor dos azeites virgens foi feita com o auxílio do equipamento (colorímetro) Minolta CR-300 ®, com a escala C.I.E.: L (luminosidade), a* (tonalidade) e b* (cromaticidade). O termo a* varia entre a cor verde (-a) e vermelha (+a), o b* varia entre azul (-b) e amarelo (+b) e o L de 0 (escuro) a 100 (claro) (Rodrigues, 2012).

As leituras da cor foram feitas no Laboratório da Carne e do Pescado (LCP) da Escola Superior Agrária de Beja.

3.3.6 – Compostos Fenólicos Totais

Compostos fenólicos ou polifenóis são compostos naturais de origem vegetal e são sintetizados pelas plantas como metabolitos secundários, usualmente como mecanismo de defesa contra patogénicos (Barberán, 2003).

Estes compostos têm a capacidade de participar em diversas reações metabólicas celulares de oxidação-redução, regular a atividade de diferentes enzimas e distintos processos celulares e possuem atividade antioxidante, protegendo os ácidos gordos

insaturados da degradação oxidativa, sendo também benéficos em termos nutricionais e de saúde (Khurana *et al.*, 2013, *citado por* Salguero, 2014).

A determinação dos compostos fenólicos totais foi efetuada recorrendo a um procedimento interno que se baseia na leitura espectrofotométrica das absorvências a 725 nm após reação com a solução de Folin-Ciocalteu.

Procedimento Experimental

1- Preparação da solução de referência:

Mediram-se 14 ml de água destilada, 2,50 ml de mistura etanol/água (6/4) e 1,25 ml de reagente Folin-Ciocalteu para um balão volumétrico de 25ml. Agitou-se e guardou-se no escuro durante 3 minutos. Ao fim deste tempo, adicionou-se 4 ml de Na_2CO_3 a 20% e completou-se com água destilada.

2- Técnica:

Inicialmente, pesou-se rigorosamente 10g de azeite (com 3 casas decimais) e dissolveu-se em 25 ml de n-hexano 99% p.a. Transferiu-se para um ampola de 100 ml. De seguida fizeram-se três extrações, de 10 ml cada com a mistura etanol/água (6/4), recolhendo-se os três extratos para dentro de um balão de 50 ml. Aferiu-se o balão com água destilada, obtendo-se assim o extrato fenólico.

Para um balão de 25 ml mediu-se 14 ml água destilada, 5 ml de extrato fenólico (medido com pipeta diferencial) e 1,25 ml de reagente de Folin-Ciocalteu. Agitou-se energicamente e guardou-se no escuro durante 3 minutos. Após esse tempo, juntou-se 4 ml da solução Na_2CO_3 a 20%, completou-se com água destilada e guardou-se ao abrigo da luz durante uma hora. Este procedimento foi feito em triplicado para cada amostra.

As leituras dos índices espectrofotométricos foram efetuadas no Laboratório de Vinho e Azeite (LVA) da Escola Superior Agrária de Beja, recorrendo a um espectrofotómetro da marca HITACHI U-2000, a 725 nm usando células de quartzo de 1cm. Na célula de referência usou-se a solução indicada no ponto 1.

3- Resultado:

Para quantificar os polifenóis totais utilizou-se a seguinte fórmula, com um resultado expresso em mg/kg de azeite:

$$\text{Polifenóis totais (mg/kg)} = \frac{(8,53993721 \times \text{leitura} - 0,24765388) \times 10 \times 25}{\text{massa da amostra}}$$

3.4 – Tratamento estatístico dos resultados

Todos os tratamentos e gráficos foram elaborados pelo “software” Microsoft Excel 2016 e Statistica 7.

Os valores médios foram obtidos a partir de 3 réplicas laboratoriais de 9 amostras de cada cultivar analisada. Assim, cada valor médio está associado a, pelo menos, três repetições ($n = 3$). Para além das médias dos atributos foram determinados os desvios padrão, para incluir nas tabelas de resultados. A comparação entre os valores médios obtidos nas amostras das diferentes cultivares, para um determinado parâmetro, foi feita através da elaboração de gráficos de linhas e barras no Microsoft Excel 2016.

3.4.1- Análise descritiva e análise de variância

Para avaliar a qualidade dos resultados obtidos para cada um dos parâmetros foi usada a estatística descritiva, através da determinação da média, desvio e erro padrão, bem como intervalo de confiança da média a 95%, por amostra. E para monitorizar a evolução da degradação dos azeites ao longo das horas de exposição à luz, foram efetuadas análises de variância a um fator (teste de Scheffé para comparação de médias). Os valores médios foram obtidos a partir de três amostras e, em cada amostra, foram utilizadas 3 réplicas laboratoriais. Assim, cada valor médio está associado a três repetições ($n = 3$).

Análise multivariada

A análise em componentes principais (ACP) é aplicada no sentido de resumir um grande número de variáveis (espaço multidimensional) num espaço com poucas dimensões (2 ou 3), sem se perder muita informação. A ACP é baseada na combinação linear das variáveis experimentais (atributos medidos), com variáveis artificialmente produzidas designadas por componentes principais (CP's), que formam um espaço ortogonal. Está em causa a redução de um espaço m -dimensional (variáveis originais)

num outro com menor número de dimensões, uma vez que, apenas incorpora as componentes principais significativas. A primeira componente é a que contém maior variância associada, seguindo-se a segunda e assim sucessivamente, até perfazer m -componentes, cuja soma da variância é igual à soma da variância das variáveis originais (100 %). De facto, as m -variáveis originais têm valor próprio igual a 1, “pesam” todas o mesmo, enquanto que as m -componentes têm valor próprio diferente de 1. A primeira componente é a que tem maior valor próprio, seguindo-se a segunda, e assim sucessivamente, sendo o somatório do valor próprio das m -componentes, igual ao número de variáveis utilizadas na análise. A representação gráfica das variáveis que contribuem para a explicação das componentes principais, bem como as coordenadas das amostras no plano formado pelas componentes principais (projeção das amostras no plano principal), permite reconhecer correlações existentes entre variáveis originais e estabelecer grupos de amostras com comportamento semelhante (Alvarenga, 2008).

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

No presente capítulo apresentam-se os resultados das análises após tratamento estatístico e faz-se a sua discussão recorrendo a gráficos de linhas com cores, cada cor correspondendo a uma variedade num determinado tempo, e à análise dos componentes principais.

4.1 – Resultados obtidos para os azeites virgem extra extraídos das cultivares Koroneiki, Arbequina e Arbosana após exposição à luz



Figura 7 - Amostras de azeite extraídas das cultivares Arbequina, Arbosana e Koroneiki expostas à luz

Para melhor se diferenciarem as amostras, utilizou-se a codificação “K” para o azeite virgem proveniente da variedade Koroneiki, “Q” para Arbequina e “S” para Arbosana. As amostras foram divididas em horas de exposição à luz e encontram-se à frente de cada codificação. As recolhas foram feitas a cada 10 dias, correspondendo a 240 horas de exposição, num total de 1920 horas como demonstra a tabela 1.

Tabela 1 – Codificação das amostras relativamente às horas de exposição à luz

Amostra	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Horas	0	240	480	720	960	1200	1440	1680	1920

Os resultados obtidos serão, nas alíneas seguintes, discutidos com vista à obtenção de conclusões acerca da degradação química que os azeites virgens apresentam durante o processo de degradação por influência da luz artificial.

4.1.1 - Estatística descritiva e análise de variância

As tabelas 2, 3 e 4, representam os resultados médios, desvios padrão e os resultados da análise de variância das cultivares, que verifica a existência de diferenças significativas entre os resultados.

Tabela 2 – Caraterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras analisadas de azeite virgem da cultivar Koroneiki

	K0	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
Acidez %	0,25(0,00) ^{cde}	0,25(0,00) ^{c-e}	0,26(0,02) ^{cd}	0,25(0,00) ^{c-e}	0,23(0,02) ^{c-e}	0,28(0,00) ^c	0,24(0,01) ^{c-e}	0,26(0,02) ^{cd}	0,25(0,00) ^{c-e}
IP meq O ₂ /kg	5,23(0,06) ^{j-m}	6,30(0,17) ^{f-j}	7,27(0,32) ^{c-f}	6,93(0,15) ^{e-h}	8,90(0,4) ^b	8,13(0,21) ^{b-d}	7,07(0,12) ^{d-g}	5,87(0,06) ^{h-k}	4,70(0,00) ^{lm}
Clorofilas mg/kg	212,72(1,14) ^a	203,86(0,96) ^a	100,76(4,28) ^c	79,28(0,91) ^d	48,94(3,33) ^e	48,77(2,12) ^e	27,03(0,09) ^{gh}	21,42(0,81) ^{g-i}	17,40(1,39) ^{h-j}
Carotenos mg/kg	78,28(0,10) ^a	74,68(0,46) ^a	38,22(1,46) ^c	31,22(0,64) ^d	23,87(1,16) ^{e-g}	26,08(0,59) ^e	21,25(0,05) ^{f-h}	21,25(0,35) ^{f-h}	20,63(0,51) ^{gh}
Clorofilas/ Carotenos	2,72(0,02) ^a	2,73(0,01) ^a	2,64(0,01) ^{ab}	2,54(0,03) ^{a-c}	2,05(0,05) ^{e-g}	1,87(0,04) ^{fg}	1,27(0,00) ^{hi}	1,01(0,02) ^{ij}	0,84(0,05) ^{j-l}
K270	0,15(0,01) ^{d-h}	0,16(0,00) ^{d-g}	0,17(0,01) ^{c-f}	0,17(0,00) ^{c-f}	0,18(0,00) ^{cd}	0,17(0,00) ^{c-e}	0,20(0,00) ^b	0,21(0,01) ^b	0,22(0,00) ^b
K232	1,57(0,03) ^{de}	1,55(0,01) ^{d-h}	1,56(0,02) ^{d-g}	1,52(0,00) ^{f-i}	1,51(0,01) ^{g-j}	1,49(0,00) ^{ij}	1,57(0,00) ^{de}	1,59(0,01) ^{b-d}	1,58(0,00) ^{cd}
Polifenóis mg/kg	316,98(0,13) ^a	300,03(3,17) ^{bc}	305,65(2,18) ^{ab}	300,00(0,12) ^{bc}	291,66(0,21) ^c	253,95(0,21) ^d	254,13(0,53) ^d	235,89(0,61) ^e	241,66(1,72) ^{de}
Cor-L*	51,97(1,68) ^h	51,97(1,68) ^h	60,51(1,60) ^{f-h}	65,73(2,13) ^{c-g}	63,54(3,71) ^{e-g}	69,47(1,13) ^{b-f}	69,66(2,19) ^{b-f}	72,13(3,08) ^{a-e}	69,78(1,09) ^{b-f}
Cor-a*	-11,84(1,60) ^{a-c}	-11,29(0,29) ^{a-c}	-12,14(0,84) ^{bc}	-10,71(0,79) ^{a-c}	-11,41(1,23) ^{a-c}	-11,29(0,29) ^{a-c}	-10,24(0,34) ^{a-c}	-8,40(0,64) ^a	-8,31(1,48) ^a
Cor-b*	54,78(1,60) ^{b-f}	62,20(2,16) ^{a-c}	62,20(2,16) ^{a-c}	57,77(2,32) ^{a-e}	51,32(2,44) ^{d-f}	57,26(7,54) ^{a-e}	62,00(0,53) ^{a-d}	65,55(2,25) ^a	63,96(0,81) ^{ab}

a,b,c,... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para P<0,05, n=3 (teste de Scheffé)

Legenda: Percentagem de Acidez; IP - Índice de Peróxidos; Clorofilas; Carotenos - Carotenoides; Índice Espectrofotométrico K₂₇₀; Índice Espectrofotométrico K₂₃₂; Polifenóis; Cor-L*a*b*.

Na tabela 2 apresentam-se os resultados obtidos nas análises às amostras recolhidas de azeite virgem extra inicial e a cada 240 horas de exposição à luz artificial, até um total de 1920 horas.

Observando os resultados da percentagem de acidez, é possível verificar que houve uma variação insignificante deste parâmetro, comparando com a amostra inicial (K0), sendo o valor máximo atingido na K5 (0,28%), correspondendo a 1200 horas de exposição. Não houve registo de diferenças significativas, em relação à percentagem de acidez da amostra inicial.

O azeite virgem está apto para consumo até um valor máximo de acidez de 2,0% (Santos, 2009).

O Índice de Peróxidos (IP) sofreu uma ligeira variação, no entanto irregular, ao longo das horas de exposição à luz. O valor mais alto foi 8,90 meq O₂/kg registado na K4 (960 horas), não ultrapassando o limite legislado de 20 meq O₂/kg, limite que quando ultrapassado torna o azeite virgem extra impróprio para consumo. O valor registado na amostra K8 (4,70) é inferior ao da amostra que não sofreu exposição à luz (5,23), podendo ser um indicador do início da 2ª fase de oxidação, com a decomposição dos peróxidos.

Quanto ao teor de carotenoides e clorofilas, o azeite virgem extra quando sujeito à exposição da luz sofreu um decréscimo contínuo e muito acentuado dos valores comparando com os valores da amostra inicial (K0). O teor de carotenoides desceu dos iniciais 78,28 mg/kg para 20,63 mg/kg, valor mínimo atingido na amostra K8 (1920 horas). O teor em clorofilas da amostra inicial (K0) era de 212,74 mg/kg, sendo que no final do tempo de exposição à luz apresentou o valor mínimo 17,40 mg/kg na amostra K8. O decréscimo do teor de clorofilas foi muito acentuado ao longo das amostras, apresentando diferenças bastante significativas. Em relação aos carotenoides a diminuição também foi constante ao longo das horas, embora não tão acentuada como nas clorofilas que diminuiu em 10 vezes o seu teor. Esta relação pode ser verificada na razão clorofilas/carotenoides que diminui ao longo do tempo, perdendo a cor verde e intensificando a cor amarela ao longo do tempo.

Os resultados das leituras espectrofotométricas a 270 nm (K₂₇₀), demonstram que nas várias amostras analisadas os valores aumentam constantemente com as horas de

exposição à luz. O valor mais elevado foi atingido na amostra K8 (0,22) e o mais baixo foi na amostra K1 (0,16), quando comparados com os 0,15 da amostra inicial (K0), sendo as diferenças muito significativas entre as amostras. Estes resultados concordam com os respeitantes ao avanço da oxidação, uma vez que nos indicam a formação de compostos secundários da oxidação a partir da decomposição dos peróxidos.

Nos azeites virgem extra o valor limite desta absorvência é de 0,22, podendo este valor ir até a um máximo de 0,25 para o caso de azeites virgens (Santos, 2009 e Regulamento de Execução (UE) nº1348/2013). Pelo que o valor foi atingido na amostra K8 (0,22).

Relativamente às leituras espectralométricas a 232 nm (K_{232}), o aumento registado não foi tão acentuado. Neste caso, o valor mais elevado foi 1,59 na amostra K7 (1680 horas) e o mais baixo na amostra K5 (1,49). O valor relacionado com o índice de peróxidos nunca ultrapassou o limite de 2,5 estabelecido para a categoria de azeite virgem extra, uma vez que os azeites tinham valores baixos de Índice de Peróxidos.

O valor de compostos fenólicos totais da amostra inicial (K0) foi de 316,98 mg/kg. Durante o processo de oxidação por exposição à luz o teor de compostos foi diminuído. O valor mínimo registado foi de 235,89 mg/kg (K7) e o máximo foi de 305,65 mg/kg (K2). De salientar que quanto mais tempo de exposição à luz menor o conteúdo de compostos fenólicos obtidos. A diminuição foi significativa ao longo das amostras.

No estudo da cor, os valores de L^* aumentaram ligeiramente ao longo das amostras (horas). O valor mínimo de L^* foi registado na amostra K1 (51,97), aumentando para 72,13 na amostra K7, o que se traduz num ligeiro aclaramento.

Em relação ao parâmetro a^* , o valor da amostra inicial (K0) é de -11,84. Ao longo do tempo de exposição à luz o valor foi aumentando apresentando um máximo de -8,31 na amostra K8. Significando assim perda da tonalidade verde. Os valores no parâmetro b^* , aumentaram ligeiramente de 54,78 (K0) para 65,55 na amostra K7, ou seja, ganho da cor amarela. Estes resultados estão de acordo com a diminuição mais acentuada do teor de pigmentos clorofilinos em relação aos carotenoides, demonstrado assim na diminuição da relação clorofilas/ carotenos.

Tabela 3 – Caraterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras analisadas de azeite virgem da variedade Arbequina

	Q0	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8
Acidez %	0,37(0,00) ^{ab}	0,37(0,02) ^{ab}	0,38(0,02) ^{ab}	0,35(0,02) ^b	0,37(0,02) ^{ab}	0,41(0,01) ^a	0,36(0,00) ^{ab}	0,36(0,00) ^{ab}	0,39(0,00) ^{ab}
IP meq O ₂ /kg	4,23(0,12) ^m	4,77(0,20) ^{k-m}	5,71(0,14) ^{i-l}	6,91(0,05) ^{e-h}	6,06(0,19) ^{g-j}	5,70(0,08) ^{i-l}	6,14(0,03) ^{g-j}	5,68(0,28) ^{i-l}	6,06(0,06) ^{g-j}
Clorofilas mg/kg	123,61(2,84) ^b	124,82(1,88) ^b	38,12(2,33) ^f	28,44(3,49) ^f	18,52(1,17) ^{h-j}	16,37(1,31) ^{ij}	5,51(0,53) ^k	4,87(0,23) ^k	3,36(0,50) ^k
Carotenos mg/kg	50,88(1,15) ^b	53,08(0,87) ^b	17,77(0,96) ^{hi}	15,50(1,30) ^{ij}	12,57(1,73) ^{i-l}	14,00(0,38) ^{i-l}	9,67(0,26) ^l	9,58(0,58) ^l	9,98(0,66) ^{kl}
Clorofilas/ Carotenos	2,43(0,11) ^{bc}	2,35(0,07) ^{cd}	2,14(0,02) ^{de}	1,83(0,07) ^g	1,48(0,12) ^{hi}	1,17(0,06) ⁱ	0,57(0,06) ^{l-n}	0,51(0,02) ^{mn}	0,34(0,05) ⁿ
K270	0,12(0,01) ^{ij}	0,13(0,01) ^{g-j}	0,13(0,00) ^{g-j}	0,12(0,00) ^{h-j}	0,13(0,00) ^{g-j}	0,13(0,00) ^{g-j}	0,14(0,00) ^{g-j}	0,14(0,00) ^{f-j}	0,15(0,00) ^{e-i}
K232	1,52(0,00) ^{e-i}	1,55(0,00) ^{d-g}	1,46(0,01) ^j	1,55(0,00) ^{d-h}	1,55(0,01) ^{d-h}	1,56(0,01) ^{d-f}	1,55(0,01) ^{d-g}	1,55(0,01) ^{d-g}	1,55(0,01) ^{d-h}
Polifenóis mg/kg	156,74(10,18) ^{gh}	95,62(0,00) ^{ij}	88,34(0,24) ^{ij}	87,58(0,21) ^{ij}	86,53(0,00) ^{ij}	91,13(0,00) ^{ij}	96,46(0,00) ⁱ	88,02(0,12) ^{ij}	82,30(0,12) ^j
Cor-L*	65,39(3,65) ^{c-g}	72,27(1,03) ^{a-e}	71,97(0,94) ^{a-e}	72,51(1,09) ^{a-e}	73,98(0,95) ^{a-d}	73,38(0,30) ^{a-d}	75,64(0,77) ^{ab}	75,77(0,46) ^{ab}	79,38(1,20) ^a
Cor-a*	-12,63(0,21) ^{bc}	-12,43(0,46) ^{bc}	-11,57(0,14) ^{a-c}	-11,15(0,56) ^{a-c}	-11,39(0,44) ^{a-c}	-10,12(0,46) ^{a-c}	-9,05(0,30) ^{a-b}	-10,25(0,15) ^{a-c}	-10,17(0,01) ^{a-c}
Cor-b*	45,37(1,18) ^{fg}	46,30(0,87) ^{fg}	53,98(0,59) ^{b-f}	54,32(0,36) ^{b-f}	53,98(0,74) ^{b-f}	49,11(0,12) ^{e-g}	52,64(0,67) ^{c-f}	52,97(0,55) ^{c-f}	53,47(0,04) ^{b-f}

a,b,c,... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para P<0,05, n=3 (teste de Scheffé)

Legenda: Percentagem de Acidez; IP - Índice de Peróxidos; Clorofilas; Carotenos - Carotenoides; Índice Espectrofotométrico K₂₇₀; Índice Espectrofotométrico K₂₃₂; Polifenóis; Cor-L*a*b*.

Após realizar as análises às amostras de azeite virgem extra da variedade Arbequina, trataram-se estatisticamente todos os valores e os resultados encontram-se na tabela 3.

Analisando os resultados da percentagem de acidez, é possível verificar que não houve diferenças significativas nas 9 amostras estudadas ao longo do tempo, para $p < 0,05$. Os valores variaram entre 0,35% (amostra Q3) e 0,41% (amostra Q4), tendo a amostra inicial (Q0) uma acidez de 0,37%.

Relativamente aos resultados do Índice de Peróxidos (IP), a amostra inicial (Q0) que não sofreu exposição à luz apresentava um valor de 4,23 meq O_2 /kg. Durante o tempo de exposição à luz o valor aumentou gradualmente, atingindo um máximo de 6,91 meq O_2 /kg na amostra Q3, correspondendo a 720 horas de exposição à luz artificial. A partir deste momento houve uma ligeira descida do valor, mantendo-se praticamente constante até final do ensaio (6,06). O índice de peróxidos manteve-se baixo, muito inferior ao limite máximo referido no Regulamento de Execução (UE) nº1348/2013, para a categoria de azeite virgem extra e de azeite virgem que é de 20 meq O_2 /kg.

Os valores das leituras espectralométricas a 270 nm (K_{270}), demonstram que nas várias amostras analisadas os valores aumentaram continuamente mas muito ligeiramente ao longo da exposição à luz, tendo-se mantido muito abaixo do valor máximo permitido para a categoria de azeite virgem extra (0,22). O valor mais elevado foi atingido na amostra Q8 (0,15) e o mais baixo foi na amostra inicial Q0 (0,12), o que significa que, após 1920 horas de exposição à luz, a degradação oxidativa ainda não teve início.

Relativamente às leituras espectralométricas a 232 nm (K_{232}), o aumento registado não foi acentuado. Neste caso, o valor mais elevado foi 1,56 na amostra Q5 (1200 horas) e o mais baixo na amostra Q2 (1,46). Este índice, relacionado com o índice de peróxidos nunca ultrapassou o limite de 2,5, estabelecido para a categoria de azeite virgem extra.

Em relação ao conteúdo em pigmentos clorofilinos e carotenoides registou-se uma redução muito acentuada ao longo do tempo de exposição à luz. O teor em clorofilas da amostra inicial (Q0) era de 123,61 mg/kg, tendo praticamente desaparecido no final do ensaio, apresentando a amostra Q8 um teor de 3,36 mg/kg. Em relação aos carotenoides, o teor na amostra inicial (Q0) de 50,88 mg/kg foi descendo continuamente para 17,77 mg/kg na Q2 (480 horas) e para 9,58 mg/kg na amostra Q7 (1680 horas). Apesar de ambos os teores de clorofilas e carotenoides terem descido muito significativamente ao

longo de todo o processo, a destruição dos pigmentos clorofilinos foi mais acentuada, pelo que a consequência será o azeite perder da cor verde, destacando-se os tons amarelados, como se pode verificar pela diminuição da razão clorofilas/ carotenos.

O teor de polifenóis totais da amostra inicial (Q0) foi de 156,74 mg/kg. Durante o tempo de exposição à luz, o teor foi diminuído até ao valor mínimo de 82,30 mg/kg no final do ensaio, ou seja após 1920 horas de exposição à luz. A diminuição foi muito acentuada logo nas primeiras 240 horas de exposição, tendo depois diminuído ligeiramente ao longo do restante tempo do ensaio.

Em relação à evolução da cor, os valores de L^* aumentaram significativamente ao longo das amostras (horas). O valor mínimo de L^* foi registado na amostra inicial (65,39), aumentando para 79,38 na amostra Q8, o que se traduz num aclaramento do azeite extraído desta cultivar.

Em relação ao parâmetro a^* , o valor da amostra inicial (Q0) é de -12,63. Ao longo das amostras o valor foi aumentando apresentando um máximo de -9,05 na amostra Q6, o que se traduz na perda da tonalidade verde. Os valores no parâmetro b^* , aumentaram ligeiramente de 45,37 (Q0), apresentando a última amostra um valor de 53,47 ou seja, um ligeiro aumento da tonalidade amarela. Estes resultados estão de acordo com a diminuição do teor de pigmentos clorofilinos e carotenoides, demonstrando assim a diminuição da relação do teor de clorofilas/ carotenoides.

Tabela 4 - Caraterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras analisadas de azeite virgem da variedade Arbosana

	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Acidez %	0,22(0,01) ^{de}	0,25(0,01) ^{c-e}	0,24(0,01) ^{c-e}	0,22(0,00) ^{c-e}	0,22(0,00) ^{c-e}	0,23(0,01) ^{c-e}	0,19(0,00) ^e	0,21(0,02) ^{de}	0,22(0,00) ^{c-e}
IP meq O ₂ /kg	6,16(0,18) ^{g-j}	6,65(0,24) ^{e-i}	7,15(0,30) ^{d-g}	7,58(0,10) ^{c-e}	8,13(0,39) ^{b-d}	9,04(0,24) ^b	8,29(0,17) ^{bc}	10,71(0,09) ^a	10,50(0,31) ^a
Clorofilas mg/kg	131,21(1,36) ^b	124,44(1,23) ^b	55,36(2,45) ^e	54,54(1,18) ^e	21,41(2,16) ^{g-i}	10,21(0,73) ^{jk}	9,09(0,81) ^{jk}	5,44(0,34) ^k	3,97(0,25) ^k
Carotenos mg/kg	53,07(1,25) ^b	52,77(0,99) ^b	25,82(0,78) ^e	25,52(0,45) ^{ef}	14,35(1,13) ^{i-k}	11,83(0,28) ^{j-l}	12,72(0,10) ^{j-l}	10,60(0,28) ^{kl}	10,55(0,23) ^{kl}
Clorofilas/ Carotenos	2,47(0,04) ^{a-c}	2,36(0,02) ^{cd}	2,14(0,03) ^{d-f}	2,14(0,01) ^{d-f}	1,49(0,03) ^{hi}	0,86(0,03) ^{hi}	0,71(0,06) ^{k-m}	0,51(0,02) ^{mn}	0,38(0,02) ⁿ
K270	0,11(0,00) ^j	0,14(0,00) ^{e-j}	0,14(0,00) ^{g-j}	0,15(0,00) ^{d-h}	0,14(0,00) ^{e-j}	0,17(0,00) ^{c-e}	0,17(0,00) ^{c-e}	0,18(0,00) ^{cd}	0,29(0,02) ^a
K232	1,50(0,01) ^{h-j}	1,53(0,01) ^{e-i}	1,56(0,01) ^{d-g}	1,57(0,00) ^{d-f}	1,56(0,00) ^{d-f}	1,59(0,01) ^{b-d}	1,64(0,01) ^b	1,63(0,00) ^{bc}	1,96(0,01) ^a
Polifenóis mg/kg	180,95(4,71) ^f	169,20(3,52) ^{fg}	157,23(0,68) ^{gh}	152,57(1,04) ^h	151,45(2,40) ^h	150,67(2,27) ^h	150,57(1,13) ^h	143,85(1,60) ^h	144,12(0,25) ^h
Cor-L*	56,60(1,61) ^{gh}	64,58(2,59) ^{d-g}	70,42(1,36) ^{a-e}	72,35(1,14) ^{a-e}	73,95(1,37) ^{a-d}	75,58(1,43) ^{ab}	73,37(1,22) ^{a-d}	74,36(0,93) ^{a-c}	78,41(0,38) ^{ab}
Cor-a*	-13,10(0,26) ^c	-12,08(0,15) ^{bc}	-11,51(0,33) ^{a-c}	-12,12(0,33) ^{bc}	-12,49(0,11) ^{bc}	-12,30(0,10) ^{bc}	-11,18(0,95) ^{a-c}	-10,91(0,08) ^{a-c}	-9,67(1,17) ^{a-c}
Cor-b*	38,71(0,98) ^g	46,38(2,79) ^{fg}	53,64(0,07) ^{b-f}	53,85(0,47) ^{b-f}	55,44(0,33) ^{a-f}	53,25(1,20) ^{c-f}	54,68(1,95) ^{b-f}	55,09(0,47) ^{a-f}	52,23(0,48) ^{c-f}

a,b,c,... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para $P < 0,05$, $n=3$ (teste de Scheffé)

Legenda: Percentagem de acidez; IP - Índice de Peróxidos; Clorofilas; Carotenos - Carotenoides; Índice espectralfotométrico K₂₇₀; Índice espectralfotométrico K₂₃₂; Polifenóis; Cor-L*a*b*.

A tabela 4 foi elaborada com os valores médios obtidos nas análises efetuadas às amostras de azeite virgem extra da cultivar Arbosana, antes de ser submetido à exposição da luz e durante o tempo de exposição.

A percentagem de acidez da amostra inicial (S0) foi de 0,22%, este valor não variou significativamente ($p < 0,05$) nas 8 amostras sujeitas à degradação por influência da luz, tendo variado entre 0,19% (S6) e 0,25% (S5). Obteve-se o mesmo valor (0,22%) tanto na amostra inicial como na última, após 1920 horas de exposição à luz artificial.

Relativamente ao Índice de Peróxidos (IP), a amostra inicial (S0), que não sofreu exposição à luz, apresentou um valor de 6,16 meq O₂/kg. Durante o processo de exposição à luz o valor aumentou gradualmente, atingindo um máximo de 10,71 meq O₂/ kg na amostra S7, correspondendo a 1680 horas de exposição à luz artificial. As diferenças foram significativas ao longo do processo. De acordo com o Regulamento de Execução (UE) n°1348/2013, o valor máximo regulamentado para o IP, para a categoria de azeite virgem, é de 20 meq O₂/ kg. Este limite não foi ultrapassado, ficando mesmo muito abaixo, tanto na amostra inicial (S0) como nas amostras sujeitas ao ensaio.

Os valores das leituras espectrofotométricas a 270 nm (K₂₇₀), demonstram que nas várias amostras analisadas os valores aumentam constantemente com as horas de exposição à luz. O valor mais elevado foi atingido na amostra S8 (0,29), sendo de 0,11 na amostra inicial (S0). Este aumento acentuado verificou-se apenas na última amostra, tendo havido apenas uma subida ligeira até à amostra S7 (0,18). Como referido anteriormente, nos azeites virgem extra o valor limite para este índice é de 0,22, podendo este valor ir até a um máximo de 0,25 para o caso de azeites virgens (Santos, 2009 e Regulamento de Execução (UE) n°1348/2013), pelo que o valor foi ultrapassado na amostra S8 (0,29), o que poderá significar a formação de compostos secundários da oxidação.

Relativamente às leituras espectrofotométricas a 232 nm (K₂₃₂), o aumento registado não foi acentuado. Neste caso, o valor mais elevado foi 1,96 na amostra S8 (1920 horas) e o mais baixo na amostra S1 (1,53). O valor relacionado com o índice de peróxidos nunca ultrapassou o limite de 2,5 estabelecido para a categoria de azeite virgem extra.

Em relação ao teor de pigmentos clorofilinos, registou-se uma tendência acentuadamente decrescente ao longo do processo, sendo o valor na amostra inicial (S0) de 131,21 mg/kg, e de apenas 3,97 mg/Kg na amostra S8 (1920 horas). A mesma tendência foi registada para os carotenoides. O teor da amostra inicial (S0) foi de 53,07 mg/kg, sendo que no final do tempo de exposição à luz o conteúdo era de 10,55 mg/kg na amostra S8. A razão clorofilas/ carotenos diminuiu ao longo do tempo de exposição, acentuando-se a cor amarelada em relação à cor verde.

O teor de compostos fenólicos totais da amostra inicial (S0) foi de 180,95 mg/kg. Durante as horas de exposição à luz, o teor foi diminuído ligeiramente. O valor mínimo registado foi de 143,85 mg/kg na amostra S7 e foi de 144,12 mg/Kg na última amostra, após 1920 hora de exposição à luz.

Na avaliação da cor, o valor de L* aumentou significativamente ao longo do tempo. O valor mínimo de L* foi registado na amostra S0 (56,60), aumentando para 78,41 na amostra S8, o que se traduz num aclaramento do azeite extraído desta cultivar.

Em relação ao parâmetro a*, o valor da amostra inicial (S0) é de -13,10. Ao longo das amostras o valor foi aumentando apresentando um máximo de -9,67 na amostra S8, o que reflete a perda da tonalidade verde. Os valores do parâmetro b* aumentaram de 38,71 (S0) para 52,23 na amostra S8, ou seja, houve um acentuar da cor amarela. Estes resultados estão de acordo com a diminuição do teor de pigmentos clorofilinos e carotenoides e da relação do teor de clorofilas/ carotenoides.

4.1.2 – Comparação gráfica entre as três cultivares

Após a análise dos valores obtidos para cada azeite virgem individualmente, é importante comparar a evolução das diferentes amostras entre si em alguns parâmetros.

Assim, para facilitar a comparação foram elaborados gráficos lineares com base nos valores médios obtidos de 3 réplicas de cada parâmetro analisado.

Percentagem de Acidez

Os resultados médios obtidos permitiram construir o gráfico relativo à percentagem de acidez dos azeites virgem extra extraídos das cultivares Arbequina, Arbosana e Koroneiki.

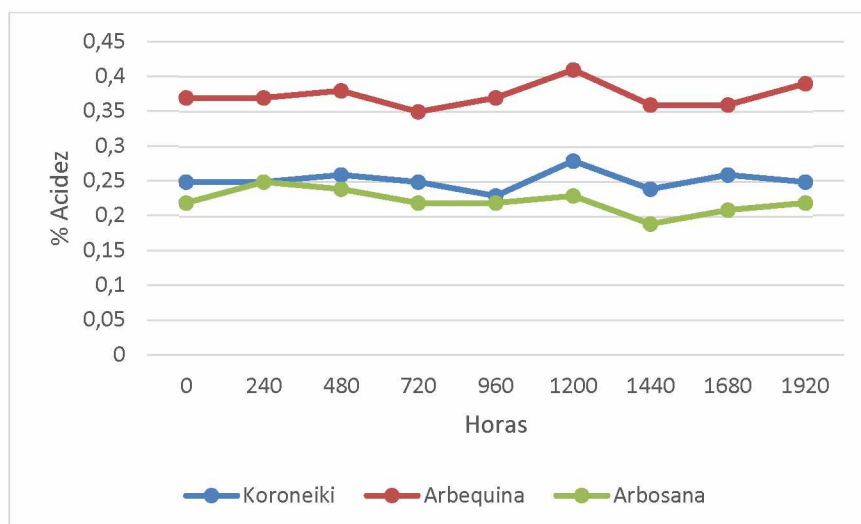


Figura 8 – Evolução da percentagem de acidez nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.

Relativamente à evolução da percentagem de acidez durante o processo de exposição à luz (figura 8) verificou-se que não houve alterações significativas, em relação ao valor inicial (0 horas) de cada cultivar, sendo a sua evolução ao longo das 1920 horas de exposição semelhante para os azeites virgens extraídos das três cultivares. Dado que a percentagem de acidez é um parâmetro que permite inferir a percentagem de ácidos gordos livres e que estes se oxidam mais facilmente do que quando esterificados na molécula de glicerol, o facto de, neste ensaio, a luz não ter influenciado o aumento deste parâmetro pode concluir-se que, em relação à quantidade de ácidos gordos livres no meio, os azeites não se tornaram potencialmente mais sensíveis à oxidação, mantendo-se com a classificação de virgem extra até final do ensaio. Resultado semelhante foi também observado por Caponio *et al.* (2005) e Del Caro *et al.* (2006) em estudos da influência da exposição à luz de azeites virgem extra das variedades *Coratina* e *Bosana* cv respetivamente, quando submetidos a condições de armazenamento idênticas às do presente trabalho. Contudo, estudos desenvolvidos por outros autores demonstraram que a exposição de azeites, monovarietais das variedades Picual e Hojiblanca, à luz conduz geralmente a um aumento dos teores de acidez (Guil-Guerrero e Urda-Romacho, 2009). No entanto, esses aumentos são geralmente bastante diminutos pelo que, frequentemente, não ocorre a perda da classificação de “azeite virgem extra” (Gutiérrez e Fernández, 2002). Ferreira (2012) verificou que a percentagem de acidez do azeite aumenta com o tempo de armazenamento, quer este seja guardado no escuro ou exposto à luz.

Índice de Peróxidos

O índice de peróxidos (IP) indica-nos o estado de oxidação do azeite através da medida dos produtos primários da oxidação que não deve exceder, segundo a legislação, os 20 meq O₂/kg de azeite. Em seguida, na figura 9 são apresentados os resultados obtidos neste estudo para os azeites nas diferentes horas de exposição à luz.

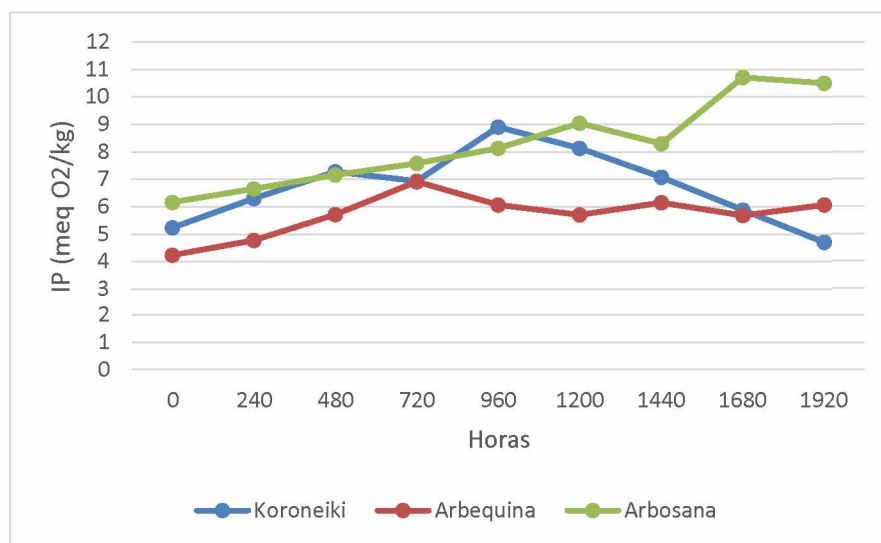


Figura 9 - Evolução do índice de peróxidos nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.

Verifica-se que nas diferentes horas de armazenamento à luz os valores de IP obtidos para os vários azeites monovarietais não ultrapassam o valor legislado (≤ 20 meq O₂/kg azeite). Inicialmente, o azeite da variedade Arbequina é o que apresenta o valor de IP inferior (4,23 meq O₂/kg azeite) quando comparado com o da variedade Koroneiki (5,23 meq O₂/kg azeite) e Arbosana (6,16 meq O₂/kg azeite). Estes valores são ligeiramente inferiores aos descritos na literatura para azeites das variedades Arbequina (5,6 meq O₂/kg azeite) cultivados na região de Almeria (Espanha) (Guil-Guerrero *et al.*, 2009), Picual (6,99 meq O₂/kg azeite) e Cobrançosa (9,55 meq O₂/kg azeite) cultivados na região de Beja (Ferreira, 2012). Contudo, nesse estudo é observada uma tendência contrária dado que o azeite Arbequina apresenta um valor de IP inferior ao da variedade Koroneiki e Arbosana. Os valores de IP são influenciados pela cultivar de azeitona, maturação e tecnologia de extração utilizadas para extrair o azeite (Ferreira, 2012).

Em azeites virgens expostos à luz ocorre frequentemente a evolução de uma oxidação primária para uma secundária e, consequentemente os valores de IP apresentados pelos azeites submetidos a estas condições de armazenamento são inferiores, pela decomposição dos peróxidos (Caponio *et al.*, 2005; Del Caro *et al.*, 2006). Neste ensaio, apesar dos valores do IP serem semelhantes para os azeites extraídos das três cultivares, verifica-se que, ao contrário dos azeites extraídos das cultivares Arbequina e Arbosana, para a cultivar Koroneiki, o valor do IP começa a descer continuamente a partir das 960 horas de exposição à luz, o que poderá significar que o azeite desta cultivar menos terá menor estabilidade oxidativa.

Índices Espectrofotométricos (K_{270} e K_{232})

Como descrito anteriormente, os índices espectrofotométricos (K_{270} , K_{232}) são parâmetros utilizados para inferir a qualidade química de um azeite. Estes parâmetros podem ser correlacionados com os resultados obtidos na determinação do índice de peróxidos na medida em que, em ambos os ensaios, se avaliam os processos oxidativos que podem ocorrer no azeite durante o seu armazenamento.

Por forma a alcançar uma maior clareza na apresentação e discussão dos resultados optou-se por apresentar gráficos ilustrativos da variação dos coeficientes K_{270} (figura 10) e K_{232} (figura 11) para os azeites monovarietais em estudo ao longo das 1920 horas de exposição.

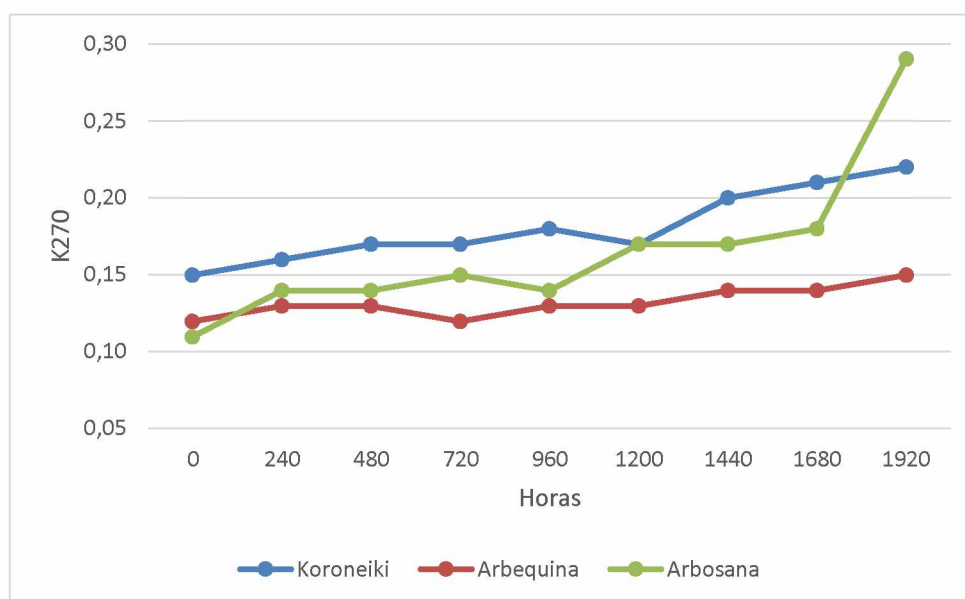


Figura 10 – Índice K_{270} para as três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.

Como se pode observar na figura 10 os valores obtidos para o índice K_{270} , para as três amostras de azeite monovarietais, são inferiores ao valor máximo permitido pela legislação para azeite virgem ($\leq 0,25$), exceto para a amostra de azeite Arbosana que às 1920 horas de armazenamento à luz apresenta um valor de 0,29. No geral é notório, para todos os azeites em estudo, um aumento progressivo dos valores de K_{270} sendo esse acréscimo mais acentuado para os tempos finais de armazenamento (1440, 1680 e 1920 horas de armazenamento). Em concreto, o índice espectrofotométrico K_{270} encontra-se correlacionado com a presença de compostos resultantes de processos de oxidação secundária. Assim, atendendo aos resultados obtidos, este processo parece ter tido um maior significado no azeite da variedade Arbosana, devido ao resultado para as 1920 horas. Estudos de Gutiérrez e Fernández (2002) assim como de Caponio *et al.* (2005) revelaram que o índice espectrofotométrico K_{270} é geralmente aquele que primeiro excede os limites legais admissíveis durante o armazenamento. Neste trabalho, esta situação apenas ocorreu para o azeite monovarietal da variedade Arbosana, às 1920 horas de armazenamento. No entanto é de realçar que, em termos gerais, o azeite extraído da cultivar Koroneiki, apresentou uma subida constante e os valores mais elevados, tendo atingido, nas 1920 de exposição à luz o limite máximo legislado para a categoria azeite virgem extra.

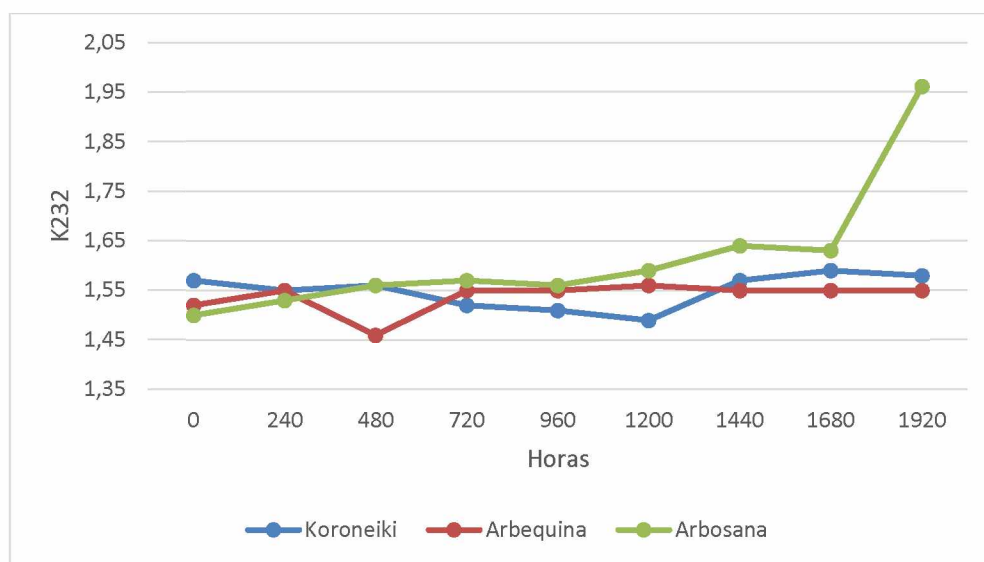


Figura 11 – Índice K_{232} para as três amostras de azeite durante o tempo de exposição à luz.

No que respeita ao índice espectrofotométrico K_{232} pode verificar-se, observando a figura 11 que, há um ligeiro aumento, semelhante para as três amostras, ao longo da exposição à luz. Apesar de a amostra extraída da cultivar Arbosana, apresentar um valor

bastante mais elevado nas 1920 horas de exposição à luz (1,96), semelhante ao sucedido para o índice k_{270} , os valores nunca ultrapassam o limite máximo permitido na legislação para a categoria virgem extra (2,50).

Em suma, no que diz respeito ao estudo da variação dos índices espectrofotométricos com as condições de armazenamento estudadas, a constatação de que os valores de K_{270} aumentam significativamente durante o armazenamento em condições de exposição à luz e, atendendo a que este índice, se encontra relacionado com os produtos secundários da oxidação (fundamentalmente trienos conjugados) é possível afirmar-se que a foto-oxidação é o mecanismo predominante de degradação dos azeites quando estes se encontram expostos à luz (Kalua *et al.*, 2006).

Pigmentos Clorofilinos e Carotenoides

Para comparação dos valores médios obtidos para os pigmentos clorofilinos e carotenoides dos azeites extraídos das três cultivares, elaboraram-se os gráficos nas figuras 12 e 13.

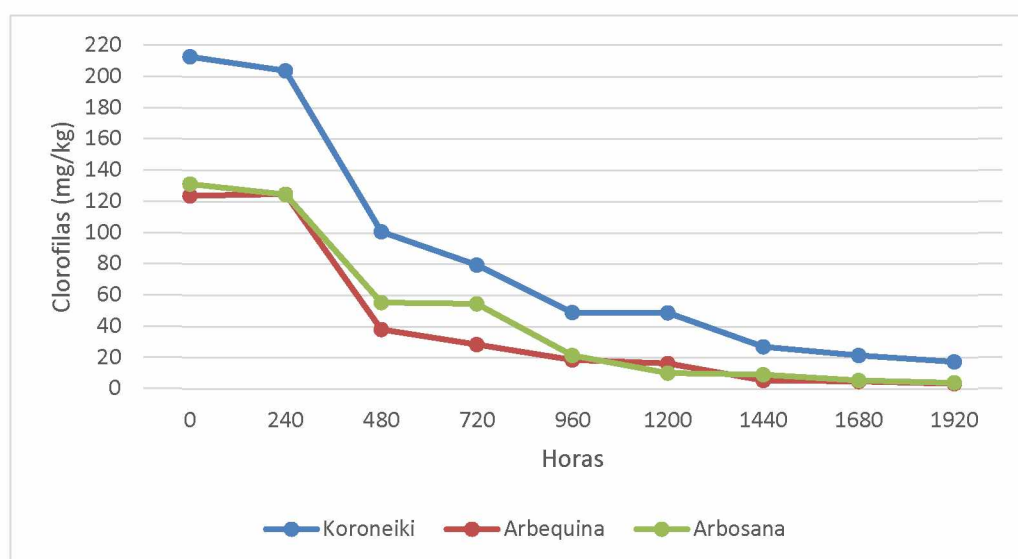


Figura 12 - Evolução dos pigmentos clorofilinos nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.

As três amostras de azeite apresentaram a mesma tendência de evolução decrescente do teor de pigmentos clorofilinos ao longo do tempo de exposição à luz. Os valores apresentados na figura 12, mostram que o azeite da variedade Koroneiki apresenta um teor inicial em clorofilas bastante mais elevado do que o das amostras extraídas das cultivares Arbequina e Arbosana. Este valor mantém-se constantemente mais elevado

ao longo do ensaio, no entanto a diferença entre as cultivares vai-se esbatendo até que no final, as três amostras apresentam um valor muito semelhante e próximo de zero. Tendo as clorofilas uma ação pró-oxidante na presença de luz, poderá concluir-se que o azeite extraído da cultivar Koroneiki terá menor estabilidade oxidativa na presença da luz. Este resultado está de acordo com a diminuição do valor de IP a partir das 960 horas de exposição à luz e com os valores do índice espectrofotométrico k270. Os azeites extraídos das cultivares Arbequina e Arbosana serão mais resistentes à foto-oxidação por apresentarem um teor inferior em compostos pró-oxidantes.

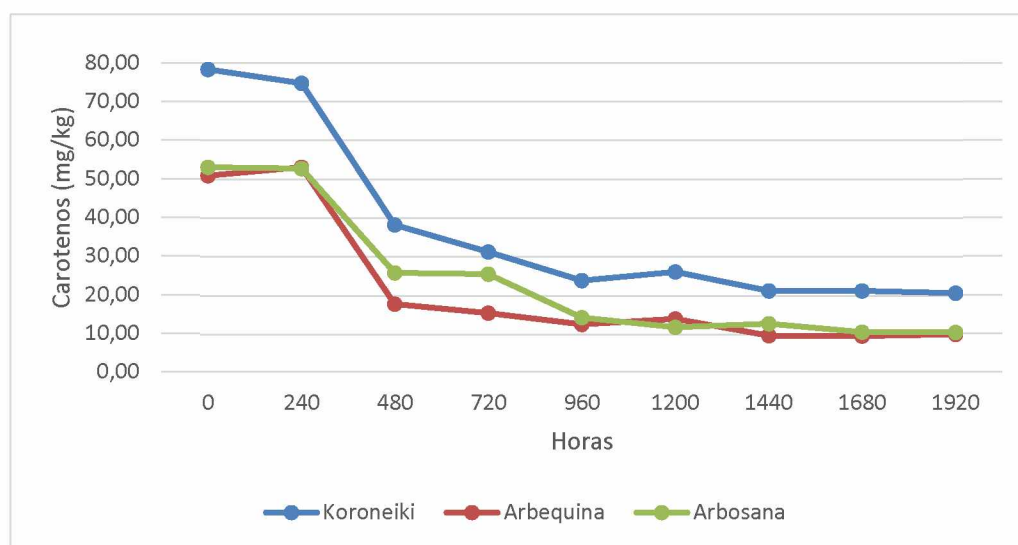


Figura 13 - Evolução dos pigmentos carotenoides nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.

Os valores apresentados na figura 13, mostram que o azeite da variedade Koroneiki apresenta o teor em carotenoides mais elevado ao longo de todo o período de armazenamento com exposição à luz. A diminuição deste conteúdo foi também acentuada nas variedades Arbequina e Arbosana, tendo a diferença entre os azeites das três cultivares diminuído ao longo do ensaio, do mesmo modo que para os pigmentos clorofilinos.

Compostos Fenólicos Totais

O teor em compostos fenólicos totais é outra das determinações relevantes na avaliação da qualidade química dos azeites. Na figura 14 encontram-se indicados os valores de concentração em polifenóis totais, expressos em mg ácido gálico/ kg azeite, para os diferentes azeites monovarietais estudados nas condições de armazenamento à luz artificial.

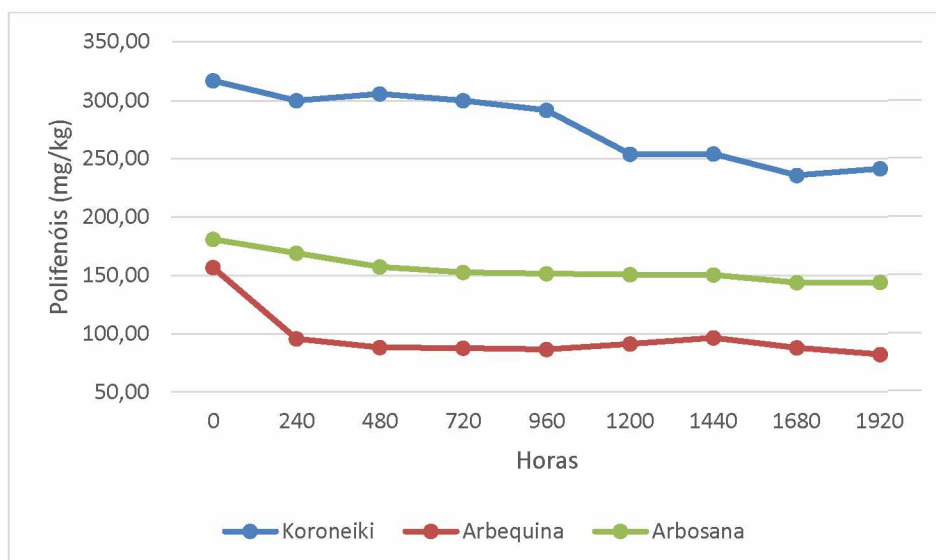


Figura 14 – Evolução dos compostos fenólicos totais nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.

Atendendo que o conteúdo em polifenóis de um azeite depende da cultivar, da localização geográfica, da altitude, do grau de maturação e do processo de extração utilizado para a obtenção do azeite (García *et al.*, 2003) seria expectável a existência de diferenças nestes teores para os diferentes azeites monovarietais em estudo neste trabalho. Por observação da figura 14, o azeite da variedade Koroneiki é o que apresenta os valores mais elevados (316,98 mg/kg azeite) tanto inicialmente como também ao longo do ensaio. O azeite extraído da cultivar Arbequina exibe o teor inicial mais baixo (156,74 mg/kg azeite) e assim se mantém ao longo do tempo do ensaio. Os valores obtidos para estes azeites monovarietais encontram-se na mesma ordem de grandeza dos obtidos por estudos desenvolvidos por outros autores para estas cultivares, utilizando o mesmo método de quantificação (Santos, 2009; Torres *et al.*, 2006; Matos *et al.*, 2007).

De acordo com a figura 14, é notória a diminuição na concentração de compostos fenólicos totais ao longo das 1920 horas de armazenamento, sendo que a cultivar Arbequina é aquela que apresenta uma menor concentração destes compostos em todas as horas de armazenamento. Esta constatação é corroborada pelos trabalhos de diversos autores (Gutiérrez e Fernández, 2002; Caponio *et al.*, 2005; Fadda *et al.*, 2012). Uma vez que estes compostos funcionam como anti-oxidantes, a sua diminuição durante o armazenamento do azeite à luz é atribuída à ocorrência de processos oxidativos (Samaniego-Sánchez *et al.*, 2012). Assim, observa-se que o azeite extraído da cultivar Koroneiki, apesar de apresentar o teor mais elevado em compostos fenólicos, foi o que sofreu a maior quebra, talvez porque, funcionando como anti-oxidantes estes compostos

protejam o azeite da ação pró-oxidante das clorofilas, mais abundantes também neste azeite.

Cor

Realizaram-se os seguintes gráficos através dos valores médios nos parâmetros L^* , a^* , b^* , para os azeites monovarietais estudados nas condições de armazenamento de luz.

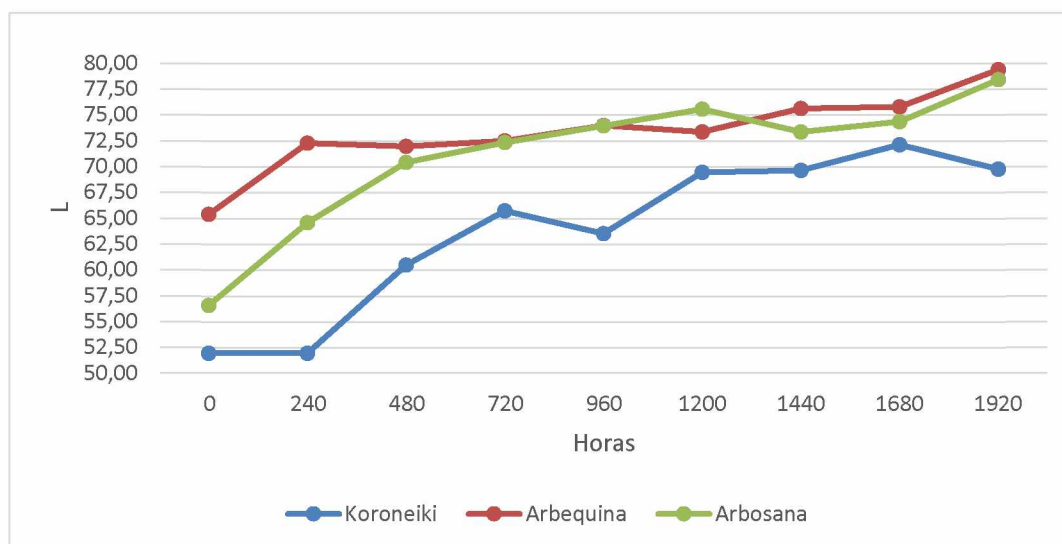


Figura 15 - Evolução da luminosidade nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.

Ao observar a figura 15, relativa ao parâmetro L^* (luminosidade), verifica-se que o azeite das três variedades sofreu um clareamento. O aumento dos valores justifica essa diminuição da luminosidade (L de 0 escuro a 100 claro). O azeite proveniente da variedade Koroneiki, apresenta uma luminosidade inferior comparativamente às outras duas variedades, significando que este azeite apresenta um conteúdo superior em compostos corados, o que está de acordo com o mais elevado teor em pigmentos clorofilinos e carotenoides.

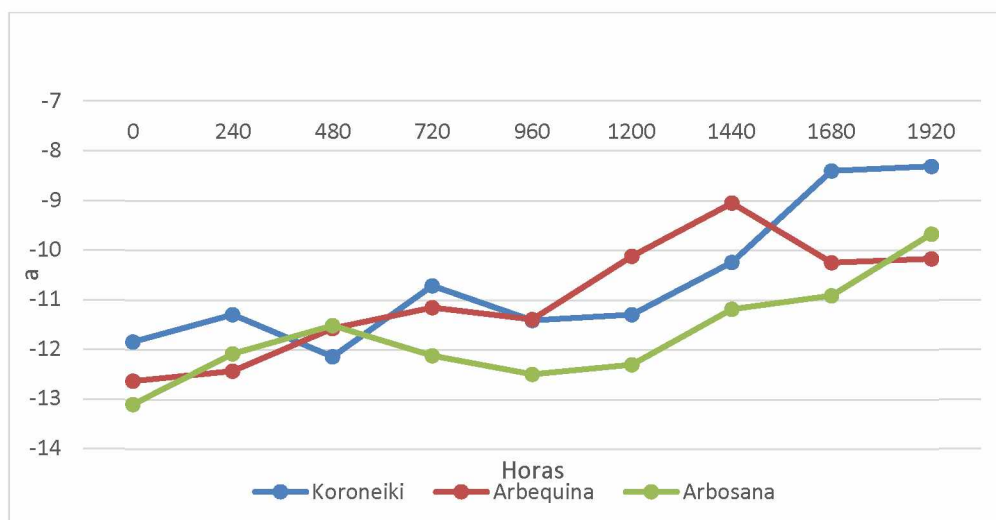


Figura 16 - Evolução da tonalidade nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.

De acordo com a figura 16, os valores encontrados para cor a^* são todos negativos ($-a^*$), indicativos da presença da tonalidade verde, fato que pode ser explicado pela coloração esverdeada do azeite promovida pelos pigmentos clorofilinos. Verificou-se uma diminuição dessa tonalidade ao longo das horas de armazenamento com exposição à luz, sendo a perda mais acentuada a partir das 960 horas de exposição à luz. De referir que as três variedades apresentam valores indicativos da presença da tonalidade verde muito próximos, no entanto de destacar que o azeite da variedade Arbosana apresenta uma ligeira superioridade em relação a essa mesma tonalidade. O azeite da cultivar Koroneiki foi a que, no final do ensaio, apresentou a perda mais acentuada da cor verde.

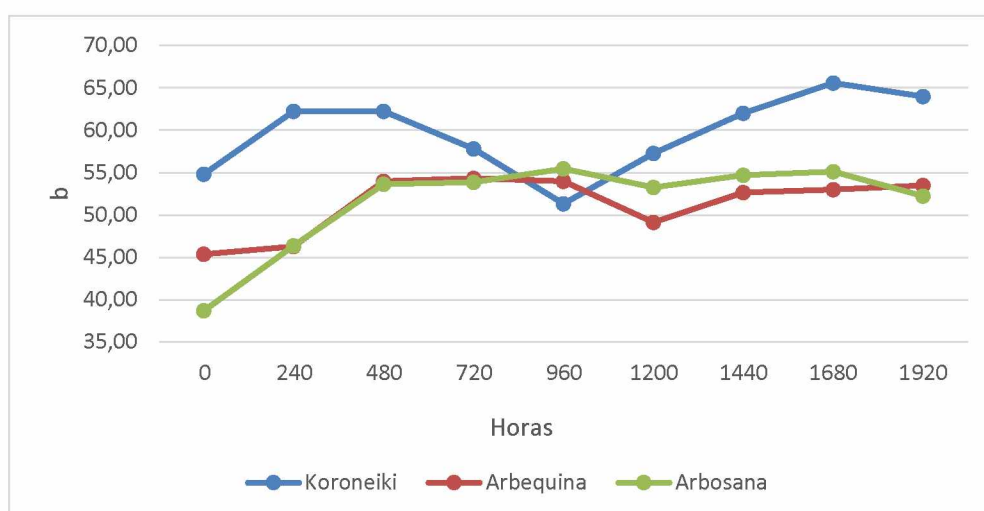


Figura 17 - Evolução da cromaticidade nas três amostras de azeite ao longo do tempo de exposição à luz.

Verifica-se através da figura 17, que a cromaticidade mais presente foi o amarelo ($+b^*$) registada ao longo das horas de armazenamento com exposição à luz. Registou-se um

aumento deste valor no azeite monovarietal das três variedades significando ganho da cor amarela, sendo mais acentuado na variedade Koroneiki. Estes resultados estão de acordo com a diminuição da razão clorofilas/ carotenoides.

4.1.3 – Análise dos componentes principais

Para resumir e melhor perceber a relação entre amostras de acordo com a sua evolução ao longo do processo de foto-oxidação foi utilizado o método da análise em componentes principais (ACP), a partir dos resultados das análises físico-químicas realizadas às amostras de azeite virgem, ao longo das 1920 horas de exposição à luz artificial. Apresentam-se os valores referentes a 11 atributos, nomeadamente: % de acidez, índice de peróxidos, absorvências a 232 e 270 nm, teor de carotenoides, teor de clorofilas, teor entre a relação carotenoides/ clorofilas, compostos fenólicos totais, cor L, a e b. Na tabela 6, apresentam-se os valores próprios e a extração dos componentes principais.

Tabela 5 - Valores próprios e extração dos componentes principais.

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio Acumulado	Variância acumulada (%)
1	4,82	43,80	4,82	43,80
2	2,92	26,54	7,74	70,34
3	1,55	14,07	9,29	84,41
4	0,86	7,79	10,15	92,20
5	0,30	2,74	10,45	94,94
6	0,20	1,86	10,65	96,80
7	0,16	1,43	10,81	98,23
8	0,09	0,86	10,90	99,09
9	0,07	0,63	10,97	99,72
10	0,03	0,26	10,99	99,98
11	0,00	0,02	11,00	100,00

Os dois primeiros componentes principais explicaram 70,34% da variância: 43,80% para o primeiro componente e 26,54 para o segundo. Estando em análise onze atributos, à partida, cada um deles tem o valor próprio de 1. Com esta metodologia, estes atributos são transformados em onze componentes, redefinindo o espaço e passando a ter valores próprios diferentes. Assim, por apresentarem valores próprios mais elevados, superiores

a 1, definiram-se os dois primeiros componentes como componentes principais: o primeiro teve valor próprio de 4,82 e o segundo 2,92.

Para perceber a importância relativa de cada atributo em relação a cada um dos dois primeiros componentes principais, determinaram-se os coeficientes de correlação entre os atributos (parâmetros originais) e os componentes principais (Tabela 7).

Os resultados da análise mostraram que o 1º componente principal, CP1, é explicado, com maior peso, pelos pigmentos (carotenoides e clorofilas) e relação entre clorofilas e carotenoides, com valores de correlação positivos e pela cor L* com valores de correlação negativos. O 2º componente principal, CP2, é explicado, com maior peso, pelos polifenóis e pela absorvência a 270 nm com valores de correlação positivos, e a acidez apresenta um valor de correlação negativa, como se pode observar na tabela 7.

Tabela 6 - Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais.

Atributos	Componente	
	CP1	CP2
Acidez (%)	-0,03	-0,81*
IP (meq O ₂ /kg)	-0,46	0,49
Clorofilas (mg/kg)	0,93*	0,19
Carotenos (mg/kg)	0,91*	0,21
Clorofilas/Carotenos	0,92*	0,07
K ₂₇₀	-0,53	0,77*
K ₂₃₂	-0,56	0,46
Polifenóis (mg/kg)	0,46	0,80*
Cor-L*	-0,88*	-0,38
Cor-a*	-0,64	0,19
Cor-b*	-0,26	0,56

* correlações significativas ($r > 0,7$).

Na tabela 7, é possível observar a distribuição dos atributos no plano principal formado pelos dois primeiros componentes.

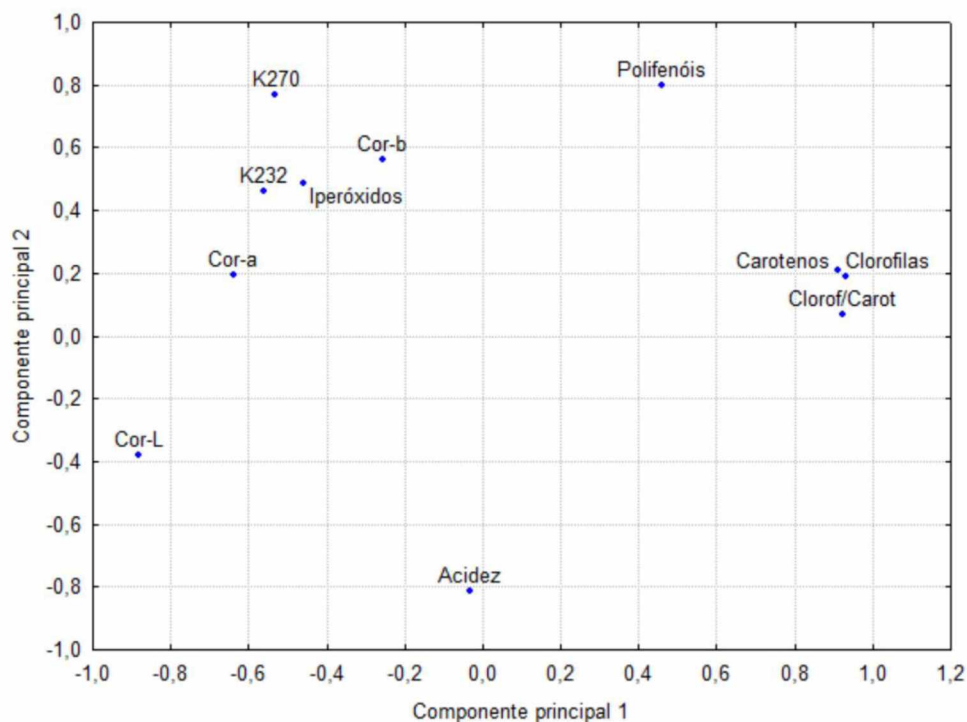


Figura 18 - Distribuição dos atributos no plano.

A figura 18 representa a projeção das amostras de Koroneiki (K), Arbequina (Q) e Arbosana (S) ao longo das 1920 horas de exposição à luz, no plano principal.

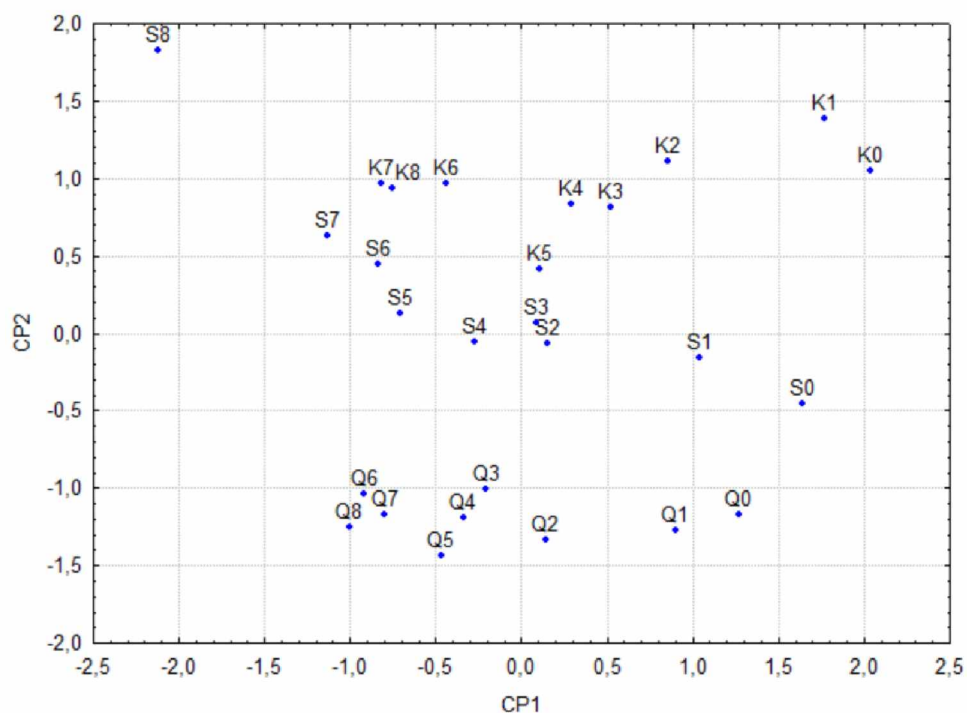


Figura 19 - Projeção das amostras ao longo das horas de exposição no plano principal.

De acordo com as figuras 18 e 19, verifica-se que há uma separação das amostras por grupos e que os grupos se separam preferencialmente por cultivar e também por horas de armazenamento com exposição à luz. Assim, o grupo das amostras correspondentes ao azeite virgem da variedade Arbequina separa-se das outras devido à sua superior percentagem de acidez. O grupo correspondente às amostras do azeite virgem da variedade Koroneiki separam-se devido aos resultados mais elevados obtidos na análise dos compostos fenólicos totais. No caso das amostras de azeite virgem da variedade Arbosana, forma-se um grupo devido ao superior índice de peróxidos. De destacar a amostra S8 (azeite virgem da variedade Arbosana com 1920 horas de armazenamento com exposição à luz) que se separa substancialmente devido ao seu elevado valor dos índices espectrofotométricos K_{270} e K_{232} . Por fim é visível uma separação das amostras iniciais (0 e 1) devido ao elevado teor em pigmentos clorofilinos e carotenoides.

4.2 – Resultados obtidos para o azeite virgem extra proveniente da moenda no moinho de discos e no moinho de martelos



Figura 20 - Moinhos de discos e de martelos montados em paralelo durante o ensaio

Em três dias consecutivos moeram-se 3 lotes de azeitona da cultivar Koroneiki, parte com um moinho de martelos e outra parte com um moinho de discos (ambos da marca Alfa Laval) (Figura 20), recolhendo-se o azeite extraído para análise na saída da centrífuga vertical. Codificaram-se as amostras do seguinte modo:

- M1, M2, M3: amostras de azeite virgem obtidas da moenda de três lotes (1, 2 e 3) de azeitonas da cultivar Koroneiki num moinho de martelos
- D1, D2, D3: amostras de azeite virgem obtidas da moenda de três lotes (1, 2 e 3) de azeitonas da cultivar Koroneiki num moinho de discos.

Apresentam-se na tabela 7 os resultados obtidos na análise dos parâmetros químicos determinados para as diferentes amostras.

Tabela 7 – Caraterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras analisadas de azeite virgem resultante da moenda por Moinho de Discos e Moinho de Martelos

	D1	D2	D3	M1	M2	M3
Acidez %	0,19 (0,00) ^d	0,23 (0,02) ^c	0,26 (0,02) ^{bc}	0,21 (0,01) ^{de}	0,27 (0,00) ^b	0,31 (0,00) ^a
IP meq O ₂ /kg	5,98 (0,01) ^b	5,53 (0,02) ^f	6,02 (0,00) ^a	5,77 (0,01) ^e	5,87 (0,01) ^d	5,93 (0,01) ^e
K270	0,13 (0,01) ^a	0,14 (0,01) ^a	0,14 (0,01) ^a	0,13 (0,00) ^a	0,14 (0,01) ^a	0,13 (0,01) ^a
K232	1,53 (0,01) ^b	1,56 (0,01) ^a	1,54 (0,01) ^{ab}	1,54 (0,00) ^{ab}	1,55 (0,01) ^{ab}	1,55 (0,01) ^{ab}
Carotenos mg/kg	25,62 (0,50) ^b	23,82 (0,06) ^b	23,87 (1,10) ^b	34,03 (0,95) ^a	31,30 (1,13) ^a	32,27 (1,36) ^a
Clorofilas mg/kg	57,91 (1,57) ^b	53,24 (0,77) ^b	53,02 (3,11) ^b	79,45 (2,00) ^a	71,67 (3,30) ^a	75,15 (3,02) ^a
Clorofilas/ Carotenos	2,26 (0,03) ^{ab}	2,24 (0,03) ^b	2,22 (0,03) ^b	2,33 (0,01) ^a	2,29 (0,02) ^{ab}	2,33 (0,02) ^a
Polifenóis mg/kg	260,77 (0,68) ^e	261,82 (0,97) ^e	273,91 (0,76) ^b	250,98 (0,37) ^d	277,53 (0,43) ^a	264,40 (0,12) ^c
Cor-L*	65,10 (2,78) ^b	69,58 (1,14) ^{ab}	75,65 (2,57) ^a	64,98 (1,63) ^b	64,89 (3,86) ^b	66,99 (1,99) ^b
Cor-a*	-10,49 (0,60) ^c	-10,22(0,30) ^c	-11,20 (0,44) ^{bc}	-11,34 (1,06) ^{bc}	-12,52 (0,41) ^{ab}	-14,11 (0,54) ^a
Cor-b*	54,53 (1,64) ^{bc}	53,68 (3,53) ^c	54,54 (0,26) ^{bc}	56,96 (3,29) ^{ac}	61,43 (0,87) ^{ab}	62,96 (1,37) ^a

a,b,c,... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para P<0,05, n=3 (teste de Scheffé)

Legenda: Percentagem de acidez; IP - Índice de Peróxidos; Índice espectralométrico K₂₇₀; Índice espectralométrico K₂₃₂; Carotenos - Carotenóides; Clorofilas; Polifenóis; Cor-L*a*b*.

As diferenças mais significativas nos parâmetros analisados obtiveram-se nos valores da percentagem de acidez, dos pigmentos clorofilinos e carotenoides e, consequentemente, na cor, como se pode observar na tabela 7 e nos gráficos seguintes. Assim, as amostras moídas no moinho de discos apresentam uma percentagem de acidez inferior em relação aos azeites obtidos da moenda das azeitonas no moinho de martelos, para os três lotes. Os azeites extraídos dos três lotes de azeitonas moídas no moinho de discos possuem valores de acidez de 0,19, 0,23 e 0,26 % e o azeite das azeitonas moídas no disco de martelos tem valores de acidez de 0,21, 0,27 e 0,31 %, respetivamente. Estes resultados estão de acordo com ensaios realizados por outros autores como Caponio *et al* (2001) e Caponio *et al* (2003) e mostram que os azeites extraídos de azeitonas moídas no moinho de martelos apresentam valores superiores na percentagem de acidez, o que significa uma hidrólise mais acentuada dos ácidos gordos, provavelmente devido ao aumento da temperatura no moinho provocada pela libertação de energia durante a fragmentação dos caroços.

Ao contrário dos mesmos autores, não se verificou, neste ensaio, um aumento dos valores dos parâmetros relacionados diretamente com as reações de oxidação: índice de peróxidos e índices espectrofotométricos e compostos fenólicos.

Além da percentagem de acidez, os únicos valores que variaram significativamente entre os dois tipos de moinho, são o teor de pigmentos clorofilinos e carotenoides e, consequentemente, os parâmetros relacionados com a cor. Assim, para o moinho de discos, o teor de pigmentos clorofilinos e carotenoides variou entre 57,91 mg/Kg e 53,02 e entre 23,87 mg/Kg e 25,02% respetivamente e, para o moinho de martelos, o teor de clorofilas situou-se entre 71,67 mg/Kg e 79,45 mg/Kg e o de carotenos entre 31,30 mg/Kg e 34,03 mg/Kg. A maior extração de pigmentos no moinho de martelos resulta na obtenção de azeites com uma cor mais intensa.

A partir dos resultados médios obtidos nos parâmetros analisados, construíram-se gráficos para aqueles que apresentaram diferenças mais significativas com o tipo de moinho utilizado: percentagem de acidez, pigmentos clorofilinos e carotenoides e cor (L , a^* , b^*)

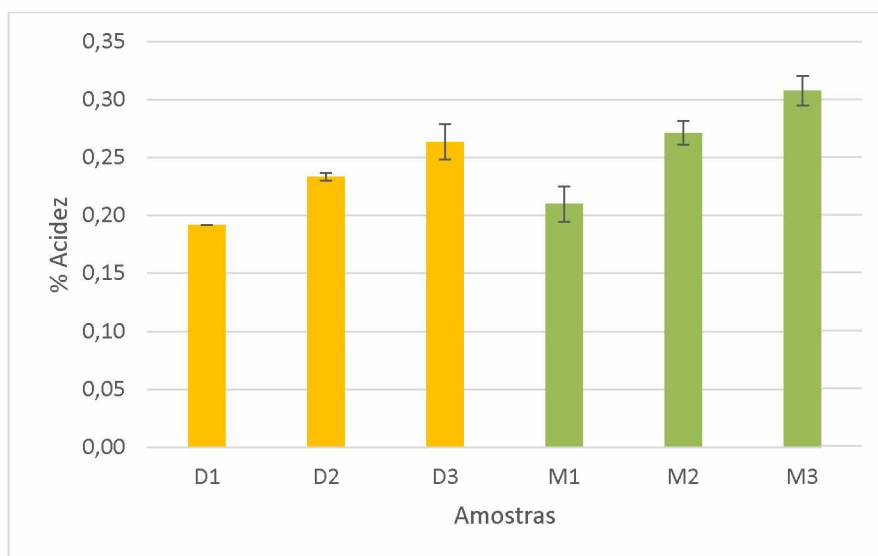


Figura 21 - Percentagem de acidez dos três lotes de azeite virgem obtidos de azeitonas moídas no moinho de discos e moinho de martelos.

Relativamente à percentagem de acidez durante o processo de moenda (figura 21), comparando os lotes respetivos D1 e M1, D2 e M2, D3 e M3 verificou-se que a percentagem de ácidos gordos livres é ligeiramente superior no moinho de martelos, comparativamente ao moinho de discos.

Para comparação dos valores médios obtidos para os pigmentos clorofilinos (figura 22) e carotenoides (figura 23), elaboraram-se os gráficos seguintes.

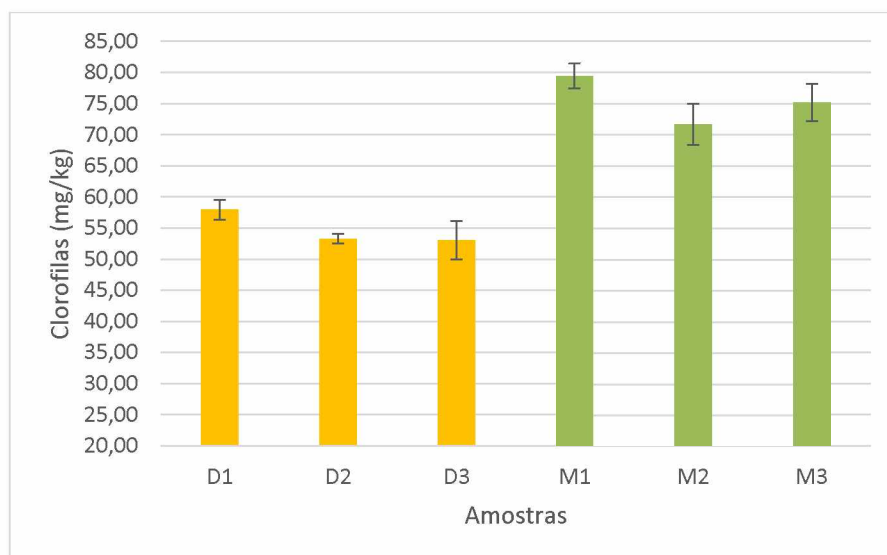


Figura 22 - Pigmentos clorofilinos dos três lotes de azeite virgem obtidos de azeitonas moídas no moinho de discos e moinho de martelos.

Os valores apresentados na figura 23, mostram que os lotes de azeite proveniente da moenda no moinho de martelos, apresentam um teor em pigmentos clorofilinos significativamente mais elevado do que os lotes respetivos moídos no moinho de discos.

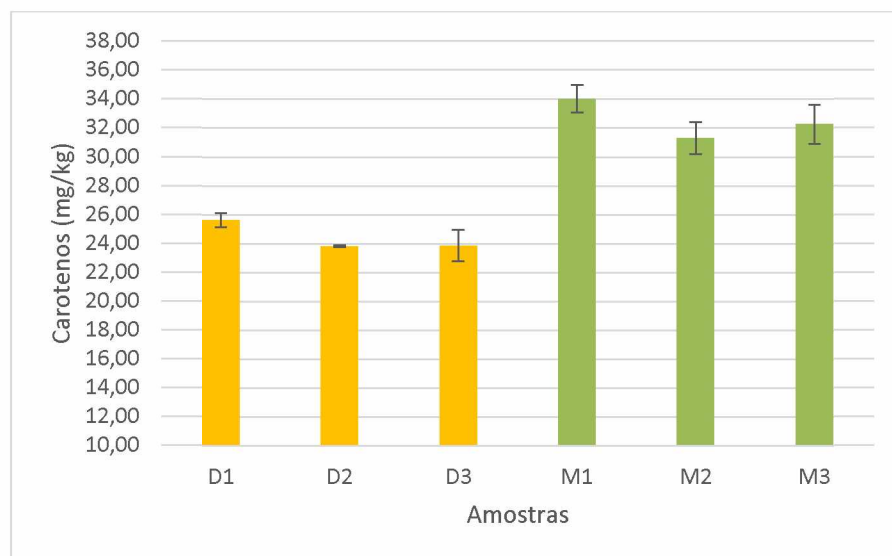


Figura 23 - Pigmentos carotenoides dos três lotes de azeite virgem obtidos de azeitonas moídas no moinho de discos e moinho de martelos.

De igual modo, o teor de pigmentos carotenoides é superior no moinho de martelos, quando se comparam os lotes respetivos ao moinho de discos.

Estes valores mais elevados no conteúdo de pigmentos, podem justificar-se pela velocidade e, consequentemente, pela temperatura mais elevada na moenda com o moinho de martelos resultando uma superior extração de compostos corados, tendo como consequência uma coloração mais intensa.

Realizaram-se os seguintes gráficos a partir dos valores médios nos parâmetros L^* (figura 24), a^* (figura 25), b^* (figura 26), para os 3 lotes de azeite moídos no moinho de discos e o moinho de martelos.

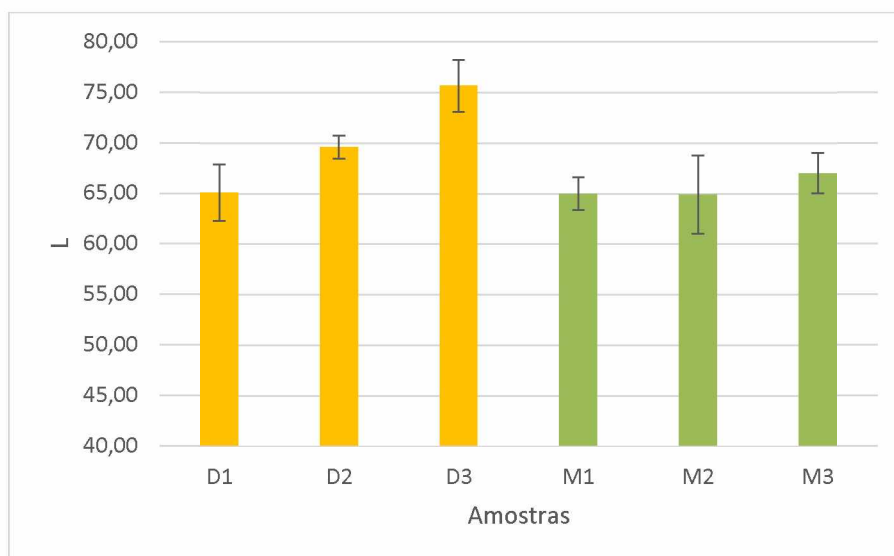


Figura 24 - Luminosidade dos três lotes de azeite virgem obtidos de azeitonas moídas no moinho de discos e moinho de martelos.

Ao observar a figura 24, relativa ao parâmetro L^* (luminosidade), verifica-se que as amostras de azeite virgem correspondentes ao moinho de discos são mais claras, comparativamente às obtidas com o moinho de martelos. O azeite proveniente do moinho de martelos, apresenta uma luminosidade inferior comparativamente ao moinho de discos, significando que este azeite apresenta um conteúdo superior em compostos corados.

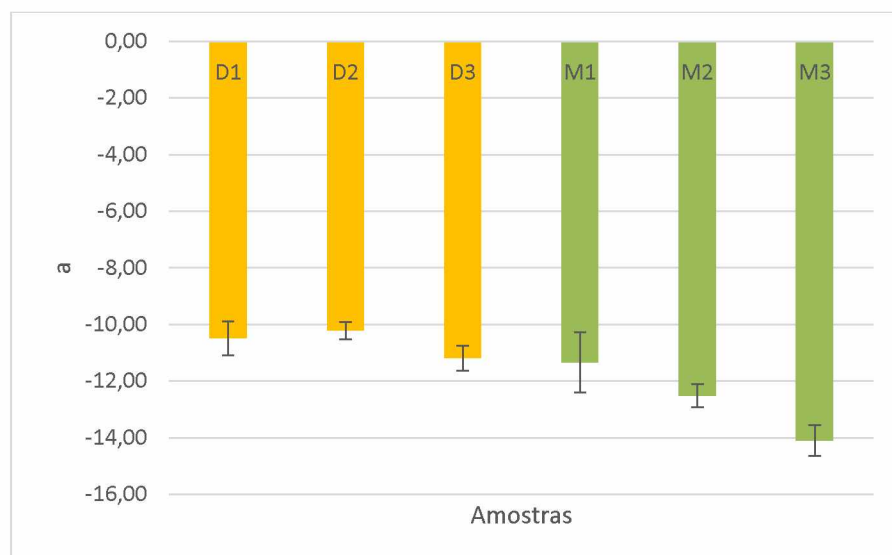


Figura 25 - Tonalidade dos três lotes de azeite virgem obtidos de azeitonas moídas no moinho de discos e moinho de martelos.

De acordo com a figura 25, os valores encontrados para cor a^* são todos negativos ($-a^*$), indicativos da presença da tonalidade verde, fato que pode ser explicado pela coloração esverdeada do azeite promovida pelos pigmentos clorofilinos. Verificou-se

uma tonalidade verde superior no moinho de martelos, como anteriormente referido nos pigmentos clorofilinos.

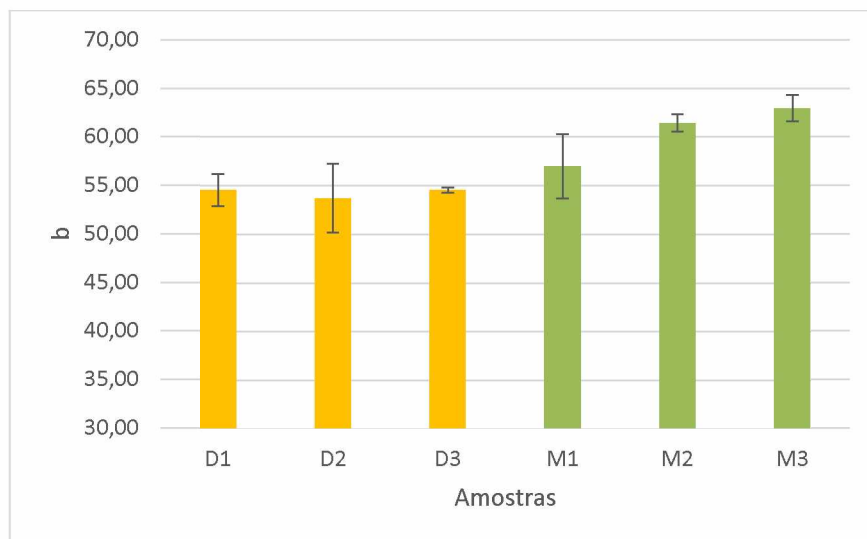


Figura 26 - Cromaticidade dos três lotes de azeite virgem obtidos de azeitonas moídas no moinho de discos e moinho de martelos.

Observando a figura 26 verifica-se que a cromaticidade mais presente foi o amarelo (+b*) registada nos azeites obtidos pela moenda de azeitonas nos dois tipos de moinho. Registou-se um valor ligeiramente superior nas amostras de azeite provenientes dos três lotes de azeitona moídos no moinho de martelos. Estes resultados estão de acordo com o teor de pigmentos clorofilinos e carotenoides.

Capítulo 5 – Conclusão

Apesar de uma coloração verde intensa ser uma característica favorável em termos sensoriais, a clorofila tem um efeito pró-oxidante quando o azeite é exposto à luz, o que diminui o tempo de conservação, ou seja, o seu tempo de prateleira. Assim, verificou-se que, no primeiro ensaio, quando as amostras de azeite virgem extraído das três cultivares: Arbequina, Arbosana e Koroneiki foram expostas a 1920 horas contínuas de luz artificial e analisadas periodicamente, verificou-se que o azeite que apresentava os parâmetros químicos relacionados com a oxidação mais elevados foi o extraído da cultivar Koroneiki, sendo este o azeite que também apresentou um conteúdo mais elevado em pigmentos clorofilinos e uma cor verde mais intensa. O conteúdo em compostos fenólicos totais, anti-oxidantes naturais, foi também o mais elevado neste azeite mas também o que mais diminuiu durante a exposição à luz, indicando a sua degradação durante o processo de oxidação. Esta desvantagem, verificada no segundo ensaio deste trabalho, poderá ser minimizada se, no equipamento utilizado para a extração do azeite desta cultivar se optar, na etapa de moenda, por um moinho de discos em detrimento do moinho de martelos. Conclui-se que a opção pelo tipo de equipamento utilizado na extração e as condições de armazenamento, embalamento e apresentação do azeite virgem nas superfícies comerciais são de extrema importância na obtenção e manutenção da qualidade do azeite virgem durante o seu tempo de vida útil ou tempo de prateleira. Apesar de uma coloração verde intensa ser uma característica favorável em termos sensoriais e também comerciais, pelo facto dos consumidores preferirem, cada vez mais, azeites verdes, de coloração intensa, no início da campanha, com as azeitonas ainda verdes, principalmente naquelas cultivares em que o conteúdo em compostos fenólicos (antioxidantes) não é muito elevado e em azeites embalados em garrafas ou garrações transparentes será preferível optar pelo moinho de discos.

Por outro lado, se se desejar aproveitar as vantagens nutricionais, sensoriais e comerciais do azeite extraído de cultivares ricas em compostos fenólicos e pigmentos clorofilinos (de ação anti-oxidante na ausência de luz), como o extraído da cultivar Koroneiki, deve optar-se por embalagens escuras e opacas, que o protejam da luz. Neste caso os azeites virgens conservar-se-ão mais tempo, pois estarão protegidos da auto-oxidação, que ocorre naturalmente, na ausência de luz.

Sugere-se que, em trabalhos futuros, se ensaie a influência do equipamento e condições de extração em outras cultivares de azeitona e se estude a influência da luz em azeites extraídos de cultivares de azeitonas em diferentes estados de maturação uma vez que, como se verificou neste trabalho, a composição química inicial do azeite é determinante na sua resistência à degradação oxidativa. Poderá assim prever-se o tempo de vida útil dos produtos, evitando que se degradem quando expostos nas superfícies comerciais, durante o prazo de validade estabelecido, perdendo a classificação anunciada no rótulo. Como se tem visto ocasionalmente na comunicação social, em azeites recolhidos e analisados pelas autoridades competentes, por exemplo a ASAE, cujo conteúdo da embalagem não corresponde à informação prestada no rótulo, a publicidade negativa pode ter efeitos muito negativos nas empresas produtoras e embaladoras de azeite virgem. O conhecimento da composição e potencial resistência à degradação do azeite virgem extraído de cada cultivar é assim de extrema importância para todos os operadores envolvidos na indústria de extração e comércio de azeite virgem de qualidade.

Referências bibliográficas

- Alvarenga, N. (2008). *Introdução da tecnologia de congelação na produção de queijo de ovelha*. Tese de doutoramento em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, p. 164.
- Alves (2013). Técnicas analíticas de controlo de qualidade de azeites. *Tese de mestrado do Instituto Politécnico de Tomar- Escola Superior de Tecnologia de Tomar*, p. 129.
- Aparício, R., Harwood, J. (2003). *Manual del aceite de oliva*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Ayton, J., Haigh, T., Tronson, D., Mailor, R. (1995). *The effect of harvest timing on olive oil quality*. Centre for Horticulture and plant Science (CHAPS). Hawkesbury Campus, Sydney, NSW.
- Baccouri, O., Guerfel, M., Baccouri, B., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Zarrouk, M., Ben Miled, D. (2008). *Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening*. Food Chemistry 109, 743-754.
- Baer, I. (2006). *Contribuição para o estudo da degradação oxidativa de azeites virgens provenientes das cultivares Cordovil de Serpa, Galega Vulgar e Verdeal Alentejana*. Dissertação de Mestrado para obtenção do Grau de Mestre. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- Baer, I. (2015). *Rastreabilidade de azeites virgens provenientes das cultivares Cordovil de Serpa e Galega Vulgar na região do Alentejo*. Dissertação de Doutoramento para obtenção do Grau Doutor. Universidade do Algarve.
- Barberán, T. (s.d.). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alim. Nutri. Salud*, 10, pp. 41-53.
- Boskou, D. (1998). *Química y Tecnología del Aceite de Oliva*. Editado por Boskou, D., Mundi Prensa Libros, S.A. Madrid, Espanha. Cap. 1-3.

- Boskou, D. (2007). Olive Oil. In More on Mediterranean Diets. *World Review of Nutrition and Dietetics*, Vol. 97. Ed. Simopoulos, A.P. & Visioli, F., Karger, Basel, 180-181.
- Caponio, F., Bilancia, M., Pasqualone, A., Sikorska, E., Gomes, T. (2005). *Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage*. Eur. Food Res Technol, 221: 92-98.
- Caponio, F., Gomes, T., Summo, C., Pasqualone, A. (2003). *Influence of the type of olive-crusher used on the quality of extra virgin olive oils*. European Journal of Science and Technology 105, 201 – 206.
- Caponio, F.; Catalano, P. (2001). *Hammer crushers vs disk crushers: the influence of working temperature on the quality and preservation of virgin olive oil*. European Food and research Technology 213: 219 – 224.
- COI – International Olive Council. *Trade Standard Applying to Olive Oils and Olivepomace Oils*. COI/ T.15/ NC nº3/ Rev.3, November 2008.
- Cuesta, C., & Sánchez-Muniz, F. (1998). *Quality control during repeated fryings*. Grasas y Aceites, 49, pp. 310-318.
- Cunha, S. (2007). *Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas. Desenvolvimento de metodologias cromatográficas para o doseamento de triacilgliceróis, fitosteróis, tocoferóis/ tocotrienóis e pesticidas*. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.
- Curci, V. (2001). *Caratteristiche dell' oliva*. In: *Manuale dell'olio d'oliva*. pp.31-43. Edagricole - Edizioni Agricole della Società Gruppo Calderini Edagricole.
- Del Caro, A., Vacca, V., Poiana, M., Fanu, P., Piga, A. (2006). *Influence of technology, storage and exposure on components of extra virgin olive oil (Bosana cv) from whole and de-stoned fruits*. Food Chem. 98, 311-316.
- Dias, S. (2009). *Pasta de azeite versus azeite virgem extra*. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.

- Fadda, C., Del Caro, A., Sanguinetti, A., Urgeghe, P. Vacca, V., Arca, P. Piga, A. (2012). *Changes during storage of quality parameters and in vitro antioxidant activity of extra virgin monovarietal oils obtained with two extraction Technologies*. Food Chem. 134, 1542-1548.
- Fernández, M., Ojeda, M., Rodríguez, A., Bernardino, J., Ruiz, L., García, A. (1991). *Elaboración de aceite de oliva de calidad*. Junta de Andalucía. Dirección General de Investigación. Tecnología e Formación Agroalimentaria e Pesquera, 5/91 Apuntes. Sevilla.
- Ferreira, A. (2012). *Influência da luz nos parâmetros químicos de qualidade em azeites monovariais*. Dissertação de Mestrado para obtenção do Grau de Mestre. Universidade de Évora. Évora.
- Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B., Roca, M., Míquez-Mosquera, M. (2005). *Effect of storage on the original pigment profile of Spanish virgin olive oil*. J. Am. Oil Chem. Soc., 82, 33-39.
- García, A., Brenes, M., García, P., Romero, C., Garrido, A. (2003). *Phenolic content of commercial olive oils*. Eur Food Res Technol, 216, 520-525.
- García, E., Luh, B., Martin, M. (2005). *Processing Fruits Science and Technology*. (Editado por Barret, D., Somogyi, L., Ramaswamy, H. CRC Press. Florida, Estados Unidos) Cap. 31.
- Gariso, S. I. (2011). *Estudo do Efeito de Reutilizações Sucessivas de Óleos de Fritura sobre Parâmetros de Qualidade*. Tese de mestrado da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Santarém, p. 100.
- Gouveia, J. (1995). *Azeites Virgens do Alto Alentejo – Comportamento Químico, Tecnológico e Sensorial*. Dissertação para obtenção de Grau de Doutor. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Gouveia, J. (2002). *História da Cultura Olivícola em Portugal*. O Azeite em Portugal. Edições Inapa.
- Granados, J. (2000). *Enciclopedia del Aceite de Oliva, Historia y Leyendas del aceite y la aceituna*. Editorial Planeta. Barcelona. 109-114; 357-372.

- Guil-Guerrero, J., Urda-Romacho, J. (2009). *Quality of extra virgin olive oil affected by several packaging variables*. Grasas y Aceites. 60, 2, 125-133.
- Gutfinger, T. (1981). *Polyphenols in olive oils*. JAOCS 11: 966-968.
- Gutiérrez, F., Fernández, J. (2002). *Determinant Parameters and Components in the Storage of Virgin Olive Oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of extra quality*. J. Agric. Food Chem. 50, 571-577.
- Henriques, L., Peres, M., Vitorino, M., Pinheiro-Alves, M., Simões, P. (s/ d/). *Estabilidade relativamente à oxidação de azeites monovarietais da Beira Baixa*. Revista de Ciências Agrárias.
- Hermoso, M., Uceda, M., Frias, L., Beltran, G. (1998). *Maduración*. In: *El cultivo del olivo*. pp. 147-161. D. Barranco, R. Fernandez-Escobar e L. Rallo (ed). Coedición Junta de Andalucía e Ediciones Mundi-Prensa.
- Huguet, A. (2010). *Análisis Químico y Sensorial de Aceites de Oliva Virgínes Extra Monovarietales del Trujal Artajo (Fontellas, Navarra)*. Tese Universidade Pública de Navarra. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.
- Kalua, C., Allen, M., Bedgood, D., Bishop, A., Prenzler, P., Robards, K. (2007). *Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: a critical review*. Food Chemistry. 100, 273-286.
- Kalua, C., Bedgood, D., Bishop, A., Prenzler, P. (2006). *Discrimination of storage conditions and freshness in virgin olive oil*. J. Agric. Food Chem. 54, 7144-7151.
- Kiritsakis, A. (1992). *El aceite de oliva*. A. Madrid Vicente, Ediciones, Madrid. 45-76, 77-82, 83-102, 131-156, 157-180.
- Kiritsakis, A., Christie, W. (2000). *Analyses of edible oils*. In: *Handbook of olive oil: analyses and properties*. pp. 129-158. J. Harwood e R. Aparicio (Ed). An Aspen Publication.
- Maia, F. M. (2014). *Estudos de estabilidade oxidativa em azeites monovarietais*. Tese de mestrado da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, p. 43.

Mailer, R., Corian, D., Ayton, J. (2005). *Olive Harvest – Harvest timing for optimal olive oil quality*. RIRDC Publication N° 05/013. RIRDC Project No DAN – 197 A.

Marques, S. P. (2013). *Calibração de métodos expeditos para determinação do teor de amido e de açúcares redutores em batata para fritar*. Tese de mestrado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, p. 49.

Matos, L., Pereira, J., Andrade, P., Seabra, R., Oliveira, M. (2007). *Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils*. Food Chem. 102, 976-983.

Melgosa, M., & Huertas, R. (2004). Proposal of a Uniform Color Scale for Virgin Olive Oils. *JAOC*, 81, pp. 323-330.

Méndez, A. I.; Falqué, E. (2007). *Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil*. Food Control 18, 521 – 529.

Minguez-Mosquera, M., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., Sánchez-Gómez, A., & Garrido-Fernandez. (1991). Color-Pigment Correlation in Virgin Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, pp. 332-336.

Morelló, J., Motilva, M., Tovar, M., Romero, M. (2004). *Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on phenolic fraction*. Food Chemistry. 85, 357-364.

Owen, R., Mier, R., Giacosa, A., Hulli, W., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000). *Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oils*. Clinical Chemistry 46 (7): 976-988.

Pagliarini, E., Zandoni, B., Giovanelli, G. (2000). *Predictive study on Tuscan extra virgin olive oil stability under several commercial conditions*. J. Agric. Food Chem. 48, 1345-1351.

Pristouri, G., Badeka, A., Kontominas, M. (2010). *Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil*. Food Control. 21, 412-418.

Rapoport, H. (1998). *Botanica y Morfologia*. In: *El cultivo del olivo*. pp. 36-60. D. Barranco, R. Fernandez-Escobar e L. Rallo (Ed). Coedicion Junta de Andalucía e Ediciones Mundi-Prensa.

Regulamento de Execução (UE) nº1348/2013, da Comissão de 16 de Dezembro de 2013 que altera o Regulamento (CEE) nº 2568/91, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial da União Europeia* L 338/31.

Ribeiro, L. (2005). *Caraterização química do aroma de azeites virgens com atributos positivos e negativos*. Tese de Doutoramento em Química, especialidade em Química Orgânica. UNL, Faculdade de Ciências e Tecnologia.

Rodrigues, D. M. (2012). *Caracterização de Tintas Alquídicas por THMGC-MS, FTIR in situ e FTIR-μS. Estudo da obra “Francisco de Assis” de Álvaro Lapa*. Tese de mestrado em Química Tecnológica. Universidade de Lisboa, p. 157.

Rossini, L. (2014). *Variedades de Azeitonas que cultivamos*. Acedido em 7 de Outubro de 2015, em: <https://azeiterossini.com.br/2014/04/27/azeitonas/>.

Ruiz, L., Rodriguez, A., Fernandez, M., Marquez, A., Pozo, M., Bernardino, J., Ayuso, M., Ojeda, M. (1991). *Análisis de aceituna*. In: *Análisis de Laboratorio de Almazara*. pp. 16-39. Edición Dirección General de Investigación y Extensión Agrárias. Centro de Información y Documentación Agrária. Sevilla.

Salguero, D. G. (2014). *Determination de la capacidad antioxidante del aceite hibrido de palma en diferentes estados de maduracion*. Obtenção do grau de Nutricionista Dietista na Faculdade de Ciências-Universidade Javeriana, p. 63.

Samaniego-Sánchez, C., Oliveras-Lopez, M., Quesados-Granados, J., Villalón-Mir, M., López, H. (2012). *Alterations in picual extra virgin olive oils under diferente storage conditions*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 114, 194-204.

Santos, M. (2009). *A influência da utilização de gás inerte na estabilidade oxidativa dos azeites virgens nos depósitos de armazenamento*. Dissertação de Mestrado para obtenção do Grau de Mestre. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.

Servilli, M., Montedoro, G. (2002). *Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality*. Eur. J. Lipid. Sci. Technol. 104, 602-613.

Silva, L. M. (2008). *Determinação da estabilidade de óleos e de compostos com actividade anti-aterosclerótica do azeite durante o processamento de alimentos*. Tese de mestrado da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, p. 145.

Stefano, G., Placquadio, P., Servilli, M., Giovacchino, L., Sciancalepone, V. (1999). *Effect of extration systems on the phenolic composition of virgin olive oils*. Fett/ Lipid 101 (9), 328-332.

Torres, M., Maestri, D. (2006). *Chemical composition of Arbequina virgin olive oil in relation to extraction and storage conditions*. J. Sci Food Agric. 86, 2311-2317.

Tsimidou, M. (1998). *Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect*. Ital. J. Food Sci. 2 (10), 99-115.

Vekiari, S., Papadopoulou, P., Kiritsakis, A. (2007). *Effects of processing methods and commercial storage conditions on the extra virgin olive oil quality indexes*. Grasas y Aceites 58, 237-242.

Velasco, J., Dobarganes, C. (2002). *Oxidative stability of virgin olive oil*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104, 661-676.

Villalta, L. (1999). *Obtención del aceite de oliva virgin*. 2ª Edición, Editorial Agrícola Española, S.A. Madrid.